

Figure 2A. Plasma TNF- α before and after IVIg

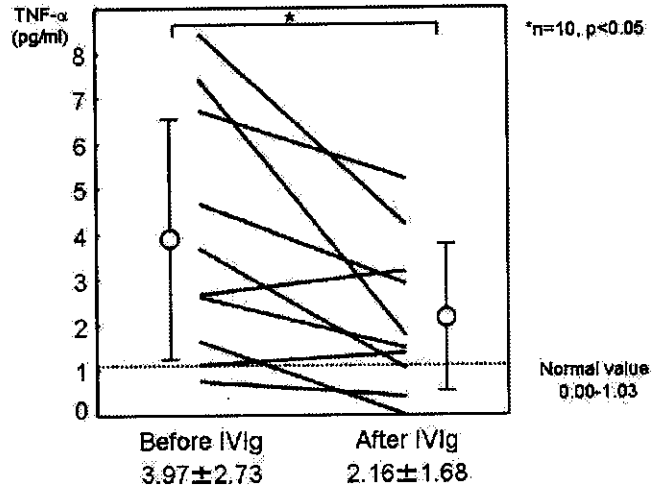


Figure 2B. Plasma IL-6 before and after IVIg

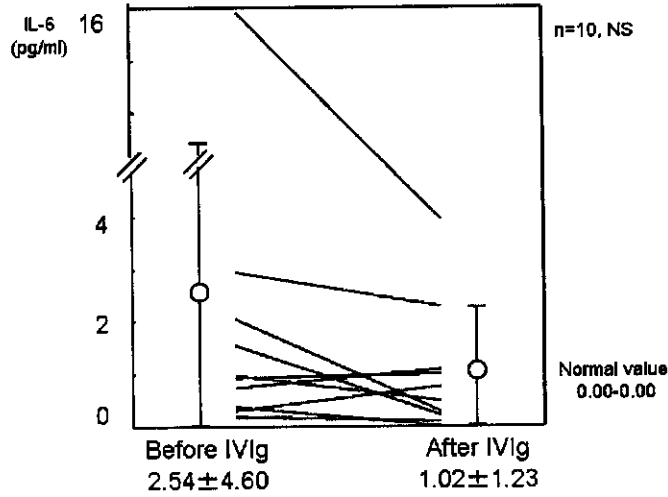


Figure 2C. Plasma IL-8 before and after IVIg

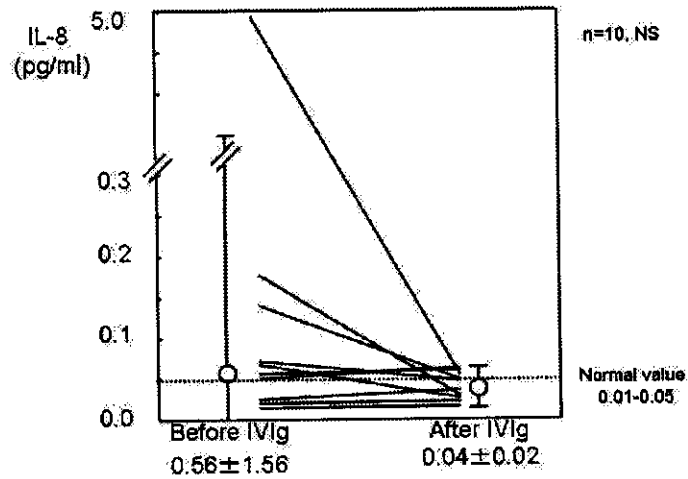


Table 1

患者番号	年齢	性	臨床診断	治療前 BVAS	IVIg 治療前検査値(血清)			組織診断	活動性 半月体(%)
					Cre (mg/dl)	CRP (mg/dl)	MPO-ANCA (EU)		
1	82	F	RPGN	17	3.20	2.50	239	CrGN	81
2	75	M	MPA recurrence	25	1.20	17.80	435	MPA recurrence	0
3	77	M	RPGN	19	1.20	3.20	25	MPGN, MPA	0
4	65	M	RPGN	26	2.00	22.00	80	CrGN, Anti-GBM GN	50
5	61	F	RPGN	15	1.42	4.28	244	MPA, CrGN	71
6	82	M	RPGN	12	4.27	10.38	159	MPA, CrGN	71
7	64	F	RPGN	19	8.34	15.35	269	CrGN	81
8	83	F	RPGN	15	0.67	7.91	144	CrGN	29
9	59	M	RPGN	15	4.40	13.90	140	MPA, CrGN	90
10	83	F	RPGN	24	2.92	0.14	617	MPA, CrGN	60
11	82	F	RPGN	21	2.38	11.27	306	MPA, CrGN	38
12	57	M	RPGN	21	4.04	9.87	239	MPA, CrGN	64
13	62	M	RPGN	21	8.23	10.14	370	MPA, CrGN	80
平均値	72			19	3.41	9.90	251		55

RPGN, 急速進行性糸球体腎炎; MPA, 多発性血管炎; BVAS, Birmingham vasculitis activity score; MPGN, 膜性増殖性腎症; Anti-GBM GN, 抗基底膜抗体腎炎.

Table 2

IVIg治療における反応性と予後

患者番号	治療前臓器障害	IVIg治療に反応した症状		IVIg後の治療			3ヶ月 予後	
		部分 寛解	完全 寛解	mPSL pulse	PDN開始量 (mg)	経口 CYC	others	透析 再発
1	S, F, E, L, K	CRP, K	S, F, E, L	(-)	20	(+)		(-) (-)
2	S, F, A, C, L, K, N	CRP, K	S, F, A, N	(-)	40	(+)		(-) (-)
3	S, F, A, L, K	CRP, K	S, A	(-)	60	(-)		(-) (-)
4	S, F, A, C, K, N	CRP, S		1g, 3日間	50	(+)	PE	(-) (-)
5	S, F, K	K, F	S	(-)	40	(-)		(-) (-)
6	S, A, K	CRP, S	S, A	(-)	40	(-)		HD (-)
7	S, F, L, K	CRP, K	S, F	(-)	40	(+)		(-) (-)
8	S, F, A, K	CRP, K	S, F	(-)	40	(-)	PE	(-) (-)
9	S, F, K	CRP, K, F		1g, 3日間	40	(+)		(-) (-)
10	S, F, L, K, Ab	CRP, K, F	S	(-)	30	(+)		(-) (-)
11	S, F, K, N	CRP, K	S	(-)	30	(-)		(-) (-)
12	S, A, L, K, N	CRP, K, N		0.5g, 3日間	45	(-)		(-) (-)
13	S, L, N	CRP, K, L	S	(-)	40	(-)		(-) (-)

S, systemic symptom; F, fever; A, arthralgia; C, cutaneous; E, ear nose throat; L, lung; Ab, abdomen; K, kidney; N, neuropathy; CRP, C-reactive protein;

mPSL, methylprednisolone sodium succinate (Solu medrol[®], Pharmacia & Upjohn);

PDN, prednisolone acetate (Predonine[®], Shionogi); CYC, cyclophosphamide (Endoxian[®], Shionogi)

PE, plasmapheresis; HD, hemodialysis.

川崎病におけるガンマグロブリン療法の現況と人工化への期待

分担研究者：岡崎富男 広島市民病院小児科・院長

研究要旨

川崎病は系統的血管炎であり、とくに冠動脈障害が最大の問題である。1983年に古庄らにより提唱された、免疫グロブリン大量静注(IVIG)療法は現在では、世界の治療の主流になっており、2g/Kg単回大量療法の血管炎抑制効果は、他の治療法に比し著明である。しかし、IVIG療法に不応である症例も10~20%存在し、IVIGの投与日、投与量や投与方法において更に、検討を要する。不応例に対してIVIGの追加投与、ウリナスタチンやステロイド剤などの併用、さらに血漿交換療法などが行われているが、その効果については結論は出ていない。また、IVIGの作用機序についても解明されておらず、今後川崎病の病因の究明とともに、ガンマグロブリンの人工化を視野に入れた更なる研究が必要である。

A. 研究背景と目的

川崎病は4歳以下の乳幼児に好発する原因不明の疾病で、全身の中・小動脈に起こる系統的血管炎を病理学的所見とする血管炎症候群である。1970年以降2年毎に行われている全国川崎病調査¹⁾によると2000年12月末までの累積患者数は約17万人であり、2000年には年間の患者数が8000人を超えている。川崎病では急性期に冠動脈の拡張や動脈瘤形成がみられ、後に狭窄や閉塞病変へと進行し、稀に心筋梗塞や突然死を来すことがある。治療上この様な冠動脈病変の発生をいかに最小限に食い止めるかが重要な課題である。川崎病が発見された当初は抗生物質、副腎皮質ステロイド剤、免疫抑制剤などが使用されていた。1970年代前半から副腎皮質ステロイド剤が主として使用され、プレドニゾン 2~4 mg/kg/日の経口投与が行われ、さらにメチルpredニゾンによるパルス療法が行われた。1977年にアスピリン 30~50 mg/kg/日の使用が提唱され、厚生省研究班によるコントロール・スタディ²⁾でアスピリンが最も良い治療成績を示したため、標準的な治療法として広く使用されていた。しかし、1983年に古庄ら³⁾が静注用ヒト免疫グロブリン

(IVIG)の大量投与が冠動脈病変の発生を抑制することを報告して以来、国内外において追試が行われ、その投与量、投与方法と治療効果について種々論議されている。

B. IVIG療法のプロトコール

古庄らは特発性血小板減少性紫斑病に対するImbachらの投与方法に準じて400 mg/kg/日を5日間投与したが、その後100 mg/kg/日や200 mg/kg/日5日間投与との比較研究が行われ⁴⁾、冠動脈病変の合併率減少効果は100 mg/kg/日では劣るものの、200 mg/kg/日とでは顕著な差が認められなかったため、1990年9月に200 mg/kg/日を5日間投与する方法が保険承認を受けた。しかし、1994年にMorikawaら⁵⁾による多施設の治療研究では200 mg/kg/日5日間より400 mg/kg/日5日間投与の方が冠動脈病変の発生を抑制する効果が大きいことが報告された。一方、米国では1991年にNewburgerら⁶⁾が多施設の治療研究で、400 mg/kg/日4日間投与より2g/kgを10時間以上かけて1回で投与した方が良い治療効果を示すことを報告し、American Heart Associationもこの用法・用量を推奨している。また Durongpisitkul

ら⁷⁾は文献的に IVIG 療法の報告例を集計し、冠動脈障害の頻度は投与量が多い程低く、しかも単回大量投与法が有用であることを報告している。本邦においても 2g/kg 1 回投与法が優れているという治療研究⁸⁾が相次いで報告されている。

以上述べたように、日本に症例の多い川崎病、MPO-ANCA 関連血管炎に関連したガンマグロブリン治療の要請が、臨床サイドからもあり、人工型の IVIG 治療法の開発を進める状況になっている。

そこで、これまでの川崎病のガンマグロブリン治療の成績のまとめと今後の人工化への展望について報告する。

C. 研究結果

1. 各治療法の治療成績

Durongpisitkul ら⁷⁾によると、冠動脈瘤の発生頻度は、30 病日においてアスピリン単独療法で 20~25%、低用量 IVIG (総量 1g/kg 以下の分割投与法) で 15~20%、高用量 IVIG (総量 1g/kg を超える量の分割投与法) では 10% 前後、超大量単回投与法 (1g/kg を超える量の単回投与) では 5% 以下となっている。

2. 初回 IVIG 療法の不応例

IVIG 療法を行ってもその治療効果が十分認められない例が全体の 10~20% に存在する。不応例の定義は一定していないが、一般的には IVIG 療法を 1クール行ない、投与終了後 24~48 時間後に解熱が見られないもの、とすることが多い。不応例に対しての追加治療は決定的なものではなく、国内のみならず国外でもその対応に苦慮している。

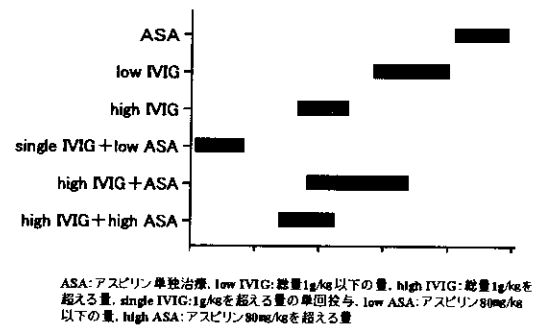


図 1. 治療法別冠動脈瘤発生頻度 (30 病日)
[文献 7) より引用]

1) IVIG 追加療法

一般的に行われるのは IVIG の追加投与である。追加投与は多くの場合 1~2g/kg 1 回投与法が用いられている。それでもまだ不応である場合 3 回以上の追加投与が行われた例もある。

2) 副腎皮質ステロイド剤

Wright ら⁹⁾は IVIG の追加治療を 2 回行っても反応しない例にメチルプレドニゾロンのパルス療法を施行し一定の効果を上げている。しかし国内での石井ら¹⁰⁾の報告では初回 IVIG 療法は 2g/kg 単回投与を行ない、不応であった者にさらに 1g/kg の追加投与を行ない、それでも不応なものを IVIG 1 g/kg 追加投与例とステロイドパルス療法施行例に分けて検討したが有意差は見られなかった。また、ステロイドは冠動脈病変の治療過程で線維芽細胞の増殖を抑え、そのため冠動脈壁の脆弱性が増して、一過性に拡大したり、冠動脈瘤が破裂し易くなる可能性がある。また、感染の危険性を高めたり、血液凝固を促進したりするため、その使用に際しては慎重な対応が必要である。

3) ウリナスタチンの投与

川崎病の急性期には末梢血中の好中球数が増加しており、好中球がエラスターゼなどのプロテアーゼや活性酸素を産生し、それらが血管内皮細胞を障害すると考えられている。最近プロテアーゼ阻害剤であるウリナスタチンが急性期の治療に有効であると報告されている。竹下ら¹¹⁾は実

験的に活性化好中球によるヒトの血管内皮細胞障害をウリナスタチンが抑制することを確認し、川崎病による血管炎の治療に有効であることを示唆した。現行の IVIG 療法だけでは冠動脈障害を完全に防止できないので、何らかの併用療法が必要であり、ウリナスタチンはその有力な候補の一つであるが、IVIG に比してウリナスタチンの炎症抑制効果は弱いため、IVIG 超大量単回投与法の補助的な治療法として位置づけるべきであるとしている。

4) 血漿交換療法

川崎病では高サイトカイン血症が存在する。そのためサイトカインの除去を目的として血漿交換療法などが試みられている。しかし、血漿交換療法は特別な機器や手技を必要とする侵襲的治療法であり、施行できる施設は限られるが、冠動脈障害の予防効果は約 80%¹²⁾ であり、考慮すべき治療法の一つである。血漿交換療法においては肺水腫や水中毒などの特有の問題の他に、体外循環を行なう上での心臓循環器への負荷、体重制限、脱血・返血ルート確保の問題、さらに一般的な感染症と置換液として使用するアルブミンによる感染症の問題がある。

D. 考察

1. IVIG の作用機序

IVIG が冠動脈障害を防止する機序としては以下の様なことが考えられる。

- ①抗原微生物やその産生毒素に対する防御抗体として作用する。
- ②IVIG の FC 部分による標的器官における免疫複合体との競合作用および血中や組織に沈着した免疫複合体を可溶化する。
- ③単球、マクロファージからのサイトカイン産生を抑制し、補体 C3 を介する組織障害を抑制する。
- ④FC 部分を介して血小板凝集能を低下させる。
- ⑤抗イディオタイプ抗体により血管内皮細胞に対して自己抗体を排除する。
- ⑥抑制 T 細胞を活性化し、B 細胞の抗体産生を抑

制する。

2. 今後の課題

川崎病において冠動脈障害を完全に防止できる治療法を確立するためには①川崎病の病態および原因の究明する。②IVIG の作用機序を解明する。③IVIG 療法の投与日、投与量、投与方法をさらに検討する。④IVIG 療法の不応例に対する治療法を確立する。⑤IVIG 療法による副作用をなくする。⑥血液製剤である IVIG を人工化する。これらの課題を解決することにより、川崎病の子どもたちが安心して治療を受けられるようにする必要がある。特に IVIG に関してはその材料となる血液の供給にも限度があり、また血液製剤であることによる感染の危険性やアナフィラキシーなど副作用の問題もあり人工化を急ぐ必要がある。

E. 結論

血管炎におけるガンマグロブリン療法は、川崎病や日本で発症数が多い MPO-ANCA 関連血管炎での治療が好成績である。国内でも、本研究班において、武曾らにより血管炎・腎炎でのガンマグロブリン製剤による治療が検討され、有効な成績が得られている。また、血液製剤であることによる安全性の問題や高価であるなど、他の自己免疫疾患・血管炎への応用が進展しない状況である。新たな視点にたった人工型の IVIG 治療法の開発が望まれるところである。

文献

- 1) 柳川洋・他：第 16 回川崎病全国調査成績。小児科診療，65(2)：332-342，2002.
- 2) 草川三治，多田羅勝義：川崎病の急性期治療研；aspirin, flurbiprofen, prednisolone+dipyridamole の 3 治療群よる prospective study. 日本小児科学雑誌，87(12)：2486-2491，1983.
- 3) 古庄巻史・他：川崎病における γ -グロブリンの大量点滴療法。基礎と臨床，17(2)：659-672，1983.

- 4) 岡崎富男・他：川崎病に対する免疫グロブリン療法；その治療効果と投与量について。小児科診療, 51(5) : 1094-1100, 1988.
- 5) Morikawa, Y. et al.: A multicenter, randomized, controlled trial of intravenous gamma globulin therapy in children with acute Kawasaki disease. *Acta Paediatr Jpn.* 36(4): 347-354, 1994.
- 6) Newburger, J.W. et al.: A single intravenous infusion of gamma globulin as compared with four infusions in the treatment of acute Kawasaki syndrome. *N. Engl. J. Med.* 324(23): 1633-1639, 1991.
- 7) Durongpisitkul, K. et al.: The prevention of coronary artery aneurysm in Kawasaki disease: a meta-analysis on the efficacy of aspirin and immunoglobulin treatment. *Pediatrics.* 96(6): 1057-1061, 1995.
- 8) Sato, N. et al.: Selective high dose gamma-globulin treatment in Kawasaki disease: assessment of clinical aspects and cost effectiveness. *Pediatr. Int.* 41(1): 1-7, 1999.
- 9) Wright, D.A. et al.: Treatment of immune globulin-resistant Kawasaki disease with pulsed doses of corticosteroids. *J. Pediatr.* 128(1): 146-149, 1996.
- 10) 石井正浩・他：【川崎病】免疫グロブリン療法の全て。小児科診療, 64(8) : 1159-1164, 2001.
- 11) 竹下誠一郎・他：「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抄録集, p26, 2002.
- 12) 今川智之・横田俊平：川崎病における血漿交換療法。小児科臨床, 50(10) : 2217-2221, 1997.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

MPO-ANCA 自己免疫疾患治療に有効な抗体作製に関する研究

分担研究者 新井孝夫 東京理科大学工学部・教授
分担研究者 佐々木次雄 国立感染症研究所細菌第二部・室長
研究協力者 大内 敬 東京理科大学工学部・助手

研究要旨

MPO ノックアウトマウスにマウス MPO を免役し、抗 MPO モノクローナル抗体を作製した。MPO に対する親和性の高かった 8 種類の抗体、15-3-12A、16-2-12H、17-3-4C、17-3-12G、17-6-5B、17-6-6C、18-1-7C、18-7-5C について調べたところ、これらの抗体すべてが MPO 活性を阻害した。このことは、MPO ノックアウトマウスから得られるモノクローナル抗体のエピトープが活性部位近傍に限定されている可能性を示している。また、これら 8 種類の抗体のクラスはすべて IgM であった。

以上のことは、MPO-ANCA 自己免疫疾患治療に有効なモノクローナル抗体作製に、MPO ノックアウトマウスを用いることの是非を評価する際に重要な鍵になると思われる。

A. 研究目的

本研究は、MPO-ANCA 自己免疫疾患のモデルマウスの治療に有効な人工グロブリン製剤を開発するプロジェクトの一環として行なわれている。平成 13 年度は、人工グロブリン作製の基礎を確立するとともに、マウス MPO と反応するマウス由来のモノクローナル抗体作製法を確立した。すなわち、市販のヒト MPO を正常マウスの足蹠に免疫する方法（通常法）よりも、MPO ノックアウトマウスにマウスリコンビナント MPO を免疫する方法（MPO-KO 法）が有用であることが示された。14 年度は、得られたモノクローナル抗体の性質を解析するための簡便な方法が試みられ、未変性 MPO との反応性、MPO 活性の阻害能、エピトープの相違について解析する 96 ウエルプレートを用いた簡便な方法が開発された。本

年度は、MPO-KO 法で作製された抗 MPO モノクローナル抗体の MPO 活性の阻害能とクラスを解析した。

B. 研究方法

モノクローナル抗体は、MPO ノックアウトマウスにマウス MPO を注射する方法で作製した。抗体の MPO 親和性は、ヒト MPO でコートしたプレートを用いた ELISA 法により調べた。MPO 活性の阻害能は、まず、96 ウエルプレートを 10% FCS でブロッキングし、次にヒト MPO とモノクローナル抗体を反応させた。1 時間後、MPO 活性を OPD (o-フェニレンジアミン) を用いて測定した。また、抗体のクラスは、Mouse monoclonal antibody isotyping kit (amersham pharmacia biotech) を用いて決定した。

(倫理面への配慮)

実験動物の動物愛護上の配慮は、本大学実験施設の指針に基づいて行った。

C. 研究結果

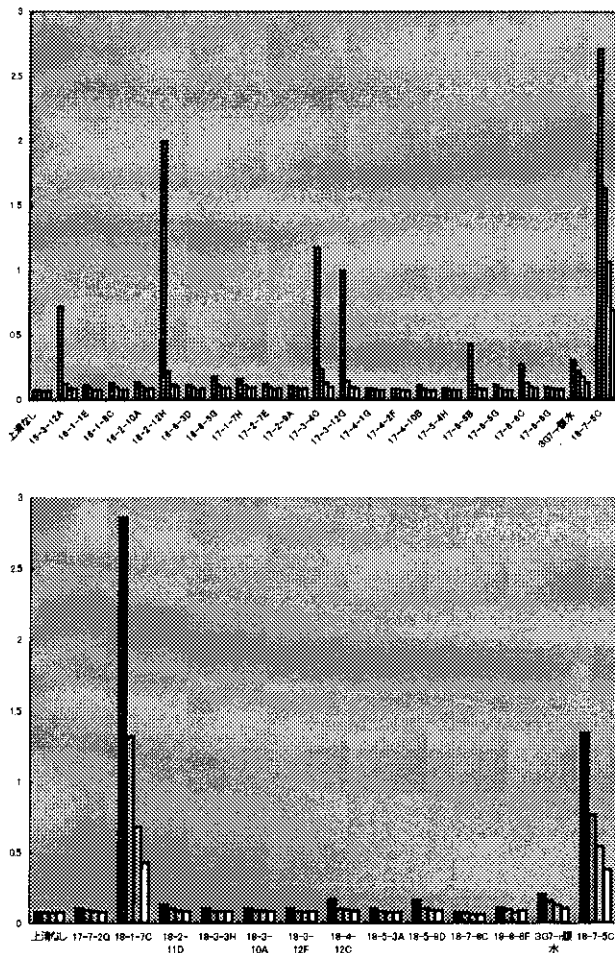


図1 ヒトMPOに対する親和性
縦軸はELISAの発色のODを示す。

はじめに、昨年度作製した3G7(通常法により作製)と18-7-5C(MPO-KO法により作製)をコントロールとして、MPO-KO法により作製した31クローンのヒトMPOに対する反応性を調べた。その結果、比較的反応性の高い7種類を新たに選択した

(図1)。

昨年度の結果よりMPO活性を阻害することが明らかにされている18-7-5Cをポジティブコントロール、10%FCSをネガティブコントロールとして、得られた7種類の抗体(15-3-12A、16-2-12H、17-3-4C、17-3-12G、17-6-5B、17-6-6C、18-1-7C)のハイブリドーマ上清のMPO阻害を調べたところ、すべてがMPOを阻害した(図2)。

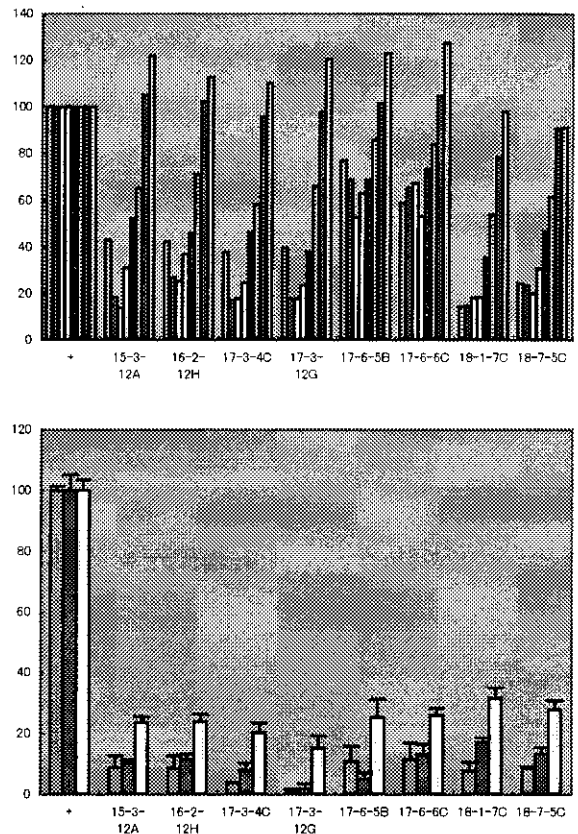


図2 MPO活性阻害能の測定

縦軸は、10%FCSと反応させたときのMPO活性を100とした相対値

次に、18-7-5Cを含むこれらの8種の抗体のクラスを決定したところ、すべてがIgMであった。昨年度の佐々木の子備的結果は、18-7-5CのクラスはIgG3であったが、本年度の新井による検討の結果、IgMであることが示された。

D. 考察

本研究は、MPO-KO 法で作製した 8 種類の抗体がすべて MPO 活性を阻害することが示している。通常法で作製した 3G7 が MPO 活性を阻害しないこと (昨年度の報告書参照) を考えると、MPO-KO 法で作製される抗体のエピトープがかなり限定されている可能性も考えられる。これは、治療効果を評価する際に、念頭に入れておく必要がある。

今回調べた抗体がすべて IgM であることは、MPO-KO マウスにおける自己抗原による B 細胞活性化の機構を考える際に興味深い。一方、人工化を考える際には、Fv 抗体あるいはヒト型抗体に変換するので、あまり問題とならない。しかし、治療効果を評価する際には、念頭に入れておく必要がある。

E. 結論

マウス MPO を免疫した MPO ノックアウトマウスの脾臓 B 細胞を材料として作製した 8 種類のモノクローナル抗体の性質を解析した。すべての抗体が MPO 活性を阻害した。また、クラスは、IgM であった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yagi, R., Suzuki, W., Seki, N., Kohyama, M., Inoue, T., Arai, T. and Kubo, M. (2002) The IL-4 production capability of different strains of native CD4+ T cells controls the differentiation

of the helper T cell response. *Int. Immunol.* 14, 1-11.

2) Yagi, R., Nagai, H., Iigo, Y., Akimoto, T., Arai, T. and Kubo, M. (2002)

Development of atopic dermatitis-like skin lesions in STAT6-deficient NC/Nga mice. *J. Immunol.* 168, 2020-2027.

3) Hashimoto, T., Wakabayashi, T., Watanabe, A., Kowa, H., Hosoda, R., Nakamura, A., Kanazawa, I., Arai, T., Takio, K., Mann, D. M. A., and Iwatsubo, T. CLAC: a novel Alzheimer amyloid plaque component derived from a transmembrane precursor, CLAC-P/collagen type XXV. *EMBO J.* 21, 1524-1534 (2002)

4) Ohuchi, T., Maruoka, S., Sakudo, A., Arai, T. Assay-based quantitative analysis of PC12 cell differentiation. *J. Neurosci. Methods* 1118, 1-8 (2002)

5) Namekawa, S., Hamada, F., Sawado, T., Ishii, S., Nara, T., Ishizaki, T., Ohuchi, T., Arai, T. and Sakaguchi, K. Dissociation of DNA polymerase α -primase complex during meiosis in *Coprinus cinereus*, *E. J. Biochem.* in press

2. 学会発表

1) 吉田健二、丸山清稔、長谷川晃子、島田稔彦、大内 敬、新井孝夫：ペルオキシナイトライトで誘因される神経細胞死からの回避活性を持つ Neoechinulin A の作用機構の解析、第 55 回日本細胞生物学会大会、横浜、2002 年 5 月

2) 石川広平、砂掘毅彦、鳥飼祐介、大内 敬、新井孝夫：抗 Thy-1 抗体及び抗ポリグルタミン酸化抗体による神経幹細胞分化の研究、

第 55 回日本細胞生物学会大会、横浜、2002 年 5 月

3) 丸山清稔、吉田健二、大内 敬、菅原二三男、新井孝夫：神経細胞死を回避させる Neoechinulin A はペルオキシナイトライト消去能を有する、第 75 回日本生化学会大会、2002 年 10 月

4) 大内 敬、柴田麻衣、前川原淳、新井孝夫：カチオン性脂質を用いたモノクローナル抗体導入法による細胞の機能解析、第 11 回日本バイオイメージング学会学術集会、名古屋、2002 年 10 月

5) 石川広平、鳥飼祐介、岡田陽介、大内 敬、新井孝夫：抗 Thy-1 抗体を用いた神経幹細胞分化の研究、第 11 回日本バイオイメージング学会学術集会、名古屋、2002 年 10 月

6) 新井孝夫、佐々木次雄、田之倉優：血管炎の治療に有効なモノクローナル抗体作製の戦略と戦術、公開シンポジウム「血管炎の発症機構解析とその治療：IVIG 治療をめぐって」、京都、2002 年 11 月

7) 大内 敬、新井孝夫：モノクローナル抗体の生細胞導入のための新しい技術の開発、公開シンポジウム「バイオイメージングとナノテクノロジー」、東京、2003 年 2 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分子構造解析による人工グロブリン作製へアプローチ

分担研究者 田之倉優 東京大学大学院農学生命科学研究科・教授

研究協力者 鈴木倫太郎

研究要旨

抗好中球細胞質抗体 (ANCA) の一つである MPO-ANCA は、血管炎などの疾患においてその量が上昇する。本研究は、治療のためのブロック抗体の開発に資するために、MPO と MPO-ANCA の分子間相互作用の様式を明らかにし、これにより合理的なブロック抗体のデザインを行うことを目的としている。我々は立体構造上の特徴と MPO フラグメントのリスクの実験結果を比較することにより特定した MPO 上の MPO-ANCA の結合部位をもとに望ましいブロック抗体の結合様式を推定した。MPO-ANCA が結合する部位の中で、MPO の活性中心から離れている α ヘリックス領域にブロック抗体が結合することで、MPO の機能を損なわずに MPO-ANCA の結合を抑制できると考えられる。

A. 研究目的

ミエロペルオキシダーゼ (MPO) は好中球で見つかった酵素であり、過酸化水素を用いて塩素イオンを過酸化し、次亜塩素酸を生成する反応を触媒する。次亜塩素酸やその二次代謝物は好中球に貪食された細菌やウイルスを殺す働きを持つ。一方、血管炎などの疾患において、抗好中球細胞質抗体 (ANCA) の一つである P-ANCA の量が上昇することが知られているが、この抗体に対応する抗原は主として MPO である。そのため P-ANCA は MPO-ANCA とも呼ばれる。MPO あるいは MPO-ANCA が疾患を引き起こす作用機作は不明であるが、これらの相互作用が原因とな

っていると考えられる。

我々の前年度までの成果により、1) 結節性多発動脈炎 (PN) および顕微鏡的多発血管炎 (MPA) 患者の重症度と関連する抗体の抗原となるリスクの高い MPO フラグメントは MPO 分子全体に分布しており、この情報だけから相互作用部位を特定することが難しい。2) しかしながら、抗原抗体反応において重要とされる極性残基および静電ポテンシャルの分布を考慮すると、MPO と MPO-ANCA の相互作用部位の候補としては、MPO の活性部位である二つのヘム結合部位に挟まれた領域が最も可能性が高い。3) これらのうちで、分

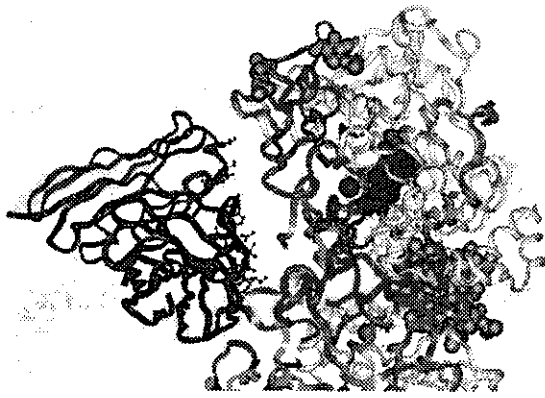


図1 MPO と抗体の結合モデル

抗チトクロムC酸化酵素抗体のF_Vフラグメントの構造(PDB ID: 1AR1)を用いて、MPO と抗体の結合モデルを作成した。

子表面に突き出ている部分は重鎖に多く、特に重鎖のN末端部に集中している。4) 重鎖のN末端部配列をもとに作成した10個のフラグメントを用いてリスク解析を行った結果、特にリスクの高い一つのフラグメントと、これよりは低いリスクを示す4つのフラグメントが見いだされた。5) これらのフラグメントをMPOの立体構造を用いて検討した結果、MPOのMPO-ANCA結合部位はMPOの活性部位周辺の溶媒に露出したループおよび α ヘリックスであることが予測された。我々はこの予測に基づき、MPOと抗体の結合モデルを作成した(図1)。

本研究はMPOとMPO-ANCAの分子間相互作用と作用機作を詳しく検討し、治療のためのブロック抗体の開発に資することを目的とする。

B. 研究方法

前年度までの結果をもとに、ブロック抗体の結合部位として望ましいと思われる領域を特定する。すなわち、MPOと

MPO-ANCA間の結合を阻害し、かつMPOの活性を阻害しないと考えられるMPO-ブロック抗体間の相互作用を、推定されたMPOとMPO-ANCAの結合様式をもとに特定する。

C. 研究結果

MPOは重鎖と軽鎖からなるヘテロダイマーが2つ結合したヘテロテトラマーである(図2)。それぞれのヘテロダイマーに糖鎖付加部位が3ヶ所あり、反応中心にヘムを持つ。

MPOが過酸化水素と反応すると、compound Iと呼ばれる $O=Fe(IV)$ ポルフィリン π カチオンラジカルが作られる。compound Iは基質塩素イオンと反応して

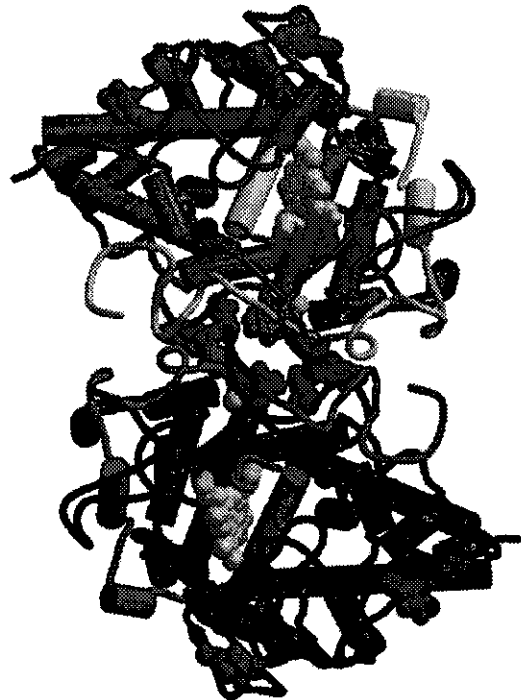


図2 MPOの立体構造(PDB ID: 1CXP)

2本の重鎖を黒および濃い灰色、2本の軽鎖を薄い灰色および白で示した。

また、ヘムを白で示した。

HOC1 を生成する。この時基質塩素イオンはヘム近傍の distal cavity に結合すると考えられている。

前年度には、MPO の MPO-ANCA 結合部位は MPO の活性部位周辺の溶媒に露出したループおよび α ヘリックスであることが予測された。現在の所、MPO-ANCA が疾患にどのように関わるかは明らかになっていないため、MPO の活性と疾患との関係も不明である。しかし、MPO-ANCA により MPO の活性が阻害など何らかの影響を受け、これにより疾患が起きると考えるのが自然である。予測された結合では、抗体は活性部位のヘムの近傍を覆うようにして結合しており、MPO の活性阻害が疾患に関することを示唆するものと言える。

MPO-ANCA の MPO との結合を阻害するた

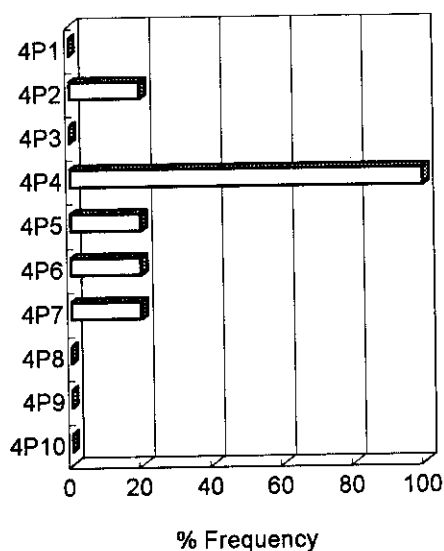


図3 MPO 重鎖 N 末端フラグメントのリスク

MPO 重鎖 N 末端の 131 残基の配列を 10~17 残基にフラグメント化し、リスクを測定した。

めには、上記の結合部位に結合するブロック抗体をデザインすればよい。しかし疾患に MPO の活性阻害が関るのであれば、この結合に際して MPO の活性阻害が起こらないことが同時に必要と推測できる。

リスクを示したフラグメントのうち、ヘムからもっとも離れているのは 4P6 および 4P7 であった。4P6 には、結合部位であると考えられる α ヘリックスの一部が含まれており、Arg185、Asn186 のような結合に関与すると考えられる残基がヘリックス表面に露出している。したがってこの部位に結合し、なおかつヘム近傍に結合しない抗体が望ましいと考えられる。

この部分には糖鎖 N-アセチル-D-グル

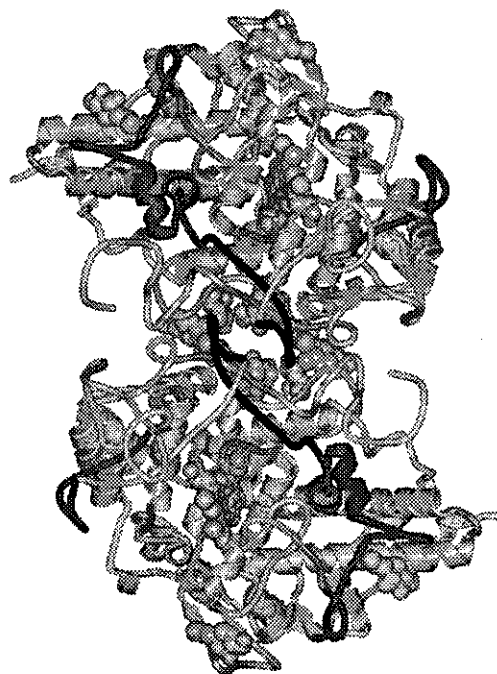


図4 リスクの高いフラグメント
特に高いリスクを示したフラグメント(4P4)を黒で、その他のリスクを示したフラグメントを灰色で示した(4P2, 4P5~7)。

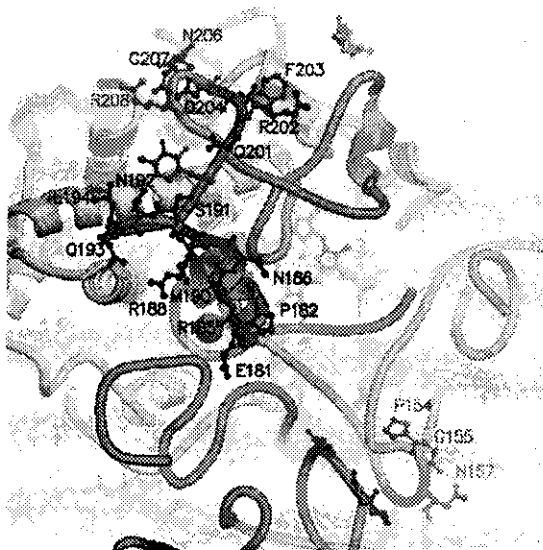


図 5 MPO のリスクの高いフラグメント上の残基分布

コサミンが Asn189 に結合して存在している。ブロック抗体がこれを覆うように結合すると、 α ヘリックスへの MPO-ANCA の接近を妨げ、MPO-MPO-ANCA 複合体の形成を阻害すると考えられる。同時にヘムの周囲は抗体から離れており、反応の妨げにならないと考えられる。

D. 考察

本研究により、ブロック抗体の結合部位として望ましいのは α ヘリックス近傍の糖鎖周辺であることが予測された。MPO-ANCA が MPO の活性を阻害することが疾患の原因となっているならば、この部位を合成して抗体を作成することにより、ブロック抗体を実現できるのではないかと考えられる。

今後は MPO-ANCA の大量発現系の構築を待って、これを利用した MPO-MPO-ANCA 複合体の立体構造解析、および MPO-ANCA の作用機作の解明を行い、さらにブロック

抗体の結合部位についての検証を行う予定である。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

1) 論文発表

Kato, Y., Ito, M., Kawai, K., Nagata, K. and Tanokura, M. (2002) Determinants of ligand specificity in groups I and IV WW domains as studied by surface plasmon resonance and model building. *J. Biol. Chem.* 277, 10173-10177.

Asami, Y., Jia, D.-W., Tatebayashi, K., Yamagata, K., Tanokura, M. and Ikeda, H. (2002) Effect of the DNA topoisomerase II inhibitor VP-16 on illegitimate recombination in yeast chromosomes. *Gene* 291, 251-257.

Sawano, Y., Muramatsu, T., Hatano, K., Nagata, K. and Tanokura, M. (2002) Characterization of genomic sequence coding for bromelain inhibitors in pineapple and expression of its recombinant isoform. *J. Biol. Chem.* 277, 28222-28227.

Iwasaki, W., Sasaki, H., Nakamura, A., Kohama, K. and Tanokura, M. (2003) Metal-free and Ca^{2+} -bound structures of a multidomain EF-hand protein, CBP40, from the lower eukaryote, *Physarum polycephalum*. *Structure* 11, 75-85

- Hatano, K., Kojima, M., Tanokura, M. and Takahashi, K. (2003) Nuclear magnetic resonance studies on the pKa values and interactions of ionizable groups in bromelain inhibitor VI from pineapple stem. *Biol. Chem.* 384, 93-104.
- Maeda, M., Takeuchi, K., Kojima, M., Tanokura, M., Kimura, K., Amemiya, Y., Kihara, H. and Takahashi, K. (2003) Kinetic studies of unfolding process of aspergillopepsin II by pH-jump methods. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301, 745-750.
- Ito, M., Kato, Y., Nagata, K., Oda, Y., Yamagoe, S., Suzuki, K. and Tanokura, M. (2002) Expression, oxidative refolding and characterization of six-histidine-tagged recombinant human LECT2, a 16-kDa chemotactic protein with three disulfide bonds. *Protein Express. Purif.*, in press.
- Katayama, H., Nagata, K., Ohira, T., Yumoto, F., Tanokura, M. and Nagasawa, H. (2003) The solution structure of molt-inhibiting hormone from the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. *J. Biol. Chem.*, in press.
- Sadykov, M., Asami, Y., Niki, H., Handa, N., Itaya, M., Tanokura, M., and Kobayashi, I. (2003) Amplification of selfish restriction modification genes. *Mol. Microbiol.*, in press
- 2) 著書, 総説等
- Okai, M., Onishi, H. and Tanokura, M. (2002) Crystallization of mutant smooth muscle myosin motor domains which have effects in ATP hydrolysis. *J. Muscle Res. Cell Motility* 23, 183.
- Yumoto, F., Nagata, K., Iwasaki, W., Adachi, K., Kobayashi, Y., Nemoto, N., Ojima, T., Nishita, K. and Tanokura, M. (2002) NMR structure analysis of the C-terminal half of Akazara scallop troponin C from striated adductor muscle. *J. Muscle Res. Cell Motility* 23, 183.
- 秦野賢一、澤野頼子、田之倉優 (2002) パイナップル由来システインプロテアーゼインヒビターの構造と機能. *化学と生物* 40 (5), 320-325.
- Hammes, B. D., Hooper, N. M. 著、田之倉優、阿久津秀雄、村松知成 訳 (2002) 生化学キーノート. シュプリンガーフェアラーク東京、東京.
- Hatano, K., Sawano, Y. and Tanokura, M. (2002) Structure-function relationship of bromelain isoinhibitors from pineapple stem. *Biol. Chem.* 383, 1151-1156.
- Sakurai, M., Tanokura, M., Zenno, S.

and Saigo, K., (2002) Identification of possible substrate-specificity determinants in NfsA, the major oxygen-insensitive nitroreductase from *Escherichia coli*. *Flavins and Flavoproteins 2002* (Chapman, S., Perham, R. and Scrutton, N. eds.) 359-361, Rudolf Weber, Berlin, Germany.

Lee, W. C., Hirai, T., Tanokura, M., Murphy, M. E. P., Zenno, S. and Saigo, K., (2002) Crystallographic analysis of a nitroreductase from *Helicobacter pylori* responsible for susceptibility to the antibiotic metronidazole. *Flavins and Flavoproteins 2002* (Chapman, S., Perham, R. and Scrutton, N. eds.) 873-877, Rudolf Weber, Berlin, Germany.

田之倉優 (2002) 生化学&ポストゲノム最前線. タンパク質の機能解析の実現に向けて. *日経サイエンス* 2002, 112.

Turner, P. C., McLennan, A. G., Bates, A. D., White, M. R. H. 著、田之倉優、村松知成、八木澤 仁 訳 (2002) 分子生物学キーノート. シュプリンガーフェアラーク東京、東京.

van Holde, K. E., Johnson, W. C., Ho, P. S. 著、田之倉優、有坂文雄 監訳、新井宗仁、小島正樹、佐々木宏、鈴木倫太郎、武田茂樹、奈良雅之、秦野賢一、湯本史明 訳 (2002) 物理生化学. 医学出版、

東京.

田之倉優 (2003) 研究室紹介. 東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻田之倉研究室. *構造生物* 8, 73-75.

青峰正裕、有田眞、今西愿、清末達人、米谷快男児、田之倉優、西丸直子 著、有田眞、山田和廣 編集 (2003) 看護生理学第2版. ヌーベルヒロカワ、東京.

田之倉優、李愚哲 (2003) 発光関連酵素の構造生物学. *日本結晶学会誌* 45 (1), 66-70.

3) 学会発表等

本間康平、李愚哲、山中亜利、中村裕彦、安宅光雄、田之倉優 (2002.6) モルフォドロムからみたタンパク質の結晶成長. 日本蛋白質科学会第2回日本蛋白質科学会年会プログラム・要旨集 80、名古屋.

李愚哲、松原俊之、大城隆、和泉好計、田之倉優 (2002.6) 脱硫酸酵素 DszB の結晶構造. 日本蛋白質科学会第2回日本蛋白質科学会年会プログラム・要旨集 80、名古屋.

湯本史明、奈良雅之、鍵裕之、岩崎わかな、尾島孝男、西田清義、永田宏次、大槻啓男、田之倉優 (2002.6) アカザラガイ閉殻筋トロポニン C およびその変異体における FT-IR による Ca²⁺、Mg²⁺配位構造解析. 日本蛋白質科学会第2回日本蛋白質科学会年会プログラム・要旨集 96、名古屋.

- 加藤有介、伊藤三恵、河合勲二、永田宏次、田之倉優 (2002. 6) グループ I, IV の WW ドメインの相互作用機構. 日本蛋白質科学会第 2 回日本蛋白質科学会年会プログラム・要旨集 103、名古屋.
- Lee, W. C., Toshiyuki, M., Ohshiro, T., Izumi, Y. and Tanokura, M. (2002. 8) The Crystal Structure of Desulfurization Enzyme DszB. Abstracts of XIX Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography Vol I (Acta Cryst. A58 (Supplement)) C105, Geneva, Switzerland.
- 田之倉優 (2002. 10) ニトロ/フラビン還元酵素の構造生物学と発生・分化の構造ゲノム科学. 第 75 回日本生化学会大会発表抄録集 3S36-7、656、京都.
- 加茂昌之、工藤紀雄、李愚哲、本島浩之、田之倉優 (2002. 10) *Thermus thermophilus* HB8 株由来 Peptide deformylase の結晶構造解析. 第 75 回日本生化学会大会発表抄録集 2P-386、773、京都.
- 古沢豊、ヴェヌゴパランナガラジャン、宮内啓介、政井英司、田之倉優、福田雅夫、千田俊哉 (2002. 10) ビフェニルジオキシゲナーゼの結晶構造解析. 第 75 回日本生化学会大会発表抄録集 3P-296、885、京都.
- 宮川拓也、秦野賢一、山村明夫、西山真、田之倉優 (2002. 10) プレセニン 1 第 6 親水性ループの精製とその活性発現の解析. 第 75 回日本生化学会大会発表抄録集 3P-627、936、京都.
- 櫻井雅弘、善野修平、西郷薫、田之倉優 (2002. 10) 大腸菌ニトロ還元酵素 NfsA のランダム変異導入による反応特異性の解析. 第 75 回日本生化学会大会発表抄録集 4P-099、984、京都.
- 秦野賢一、前田充孝、永田宏次、田之倉優、荘司顕 (2002. 10) 土壌主成分フミン酸の構造活性相関. 第 75 回日本生化学会大会発表抄録集 4P-183、998、京都.
- 村松知成、伊藤三恵、湯本史明、足立恭子、田之倉優 (2002. 10) 真核生物 eRF1 終止コドン認識ドメインの立体構造解析. 第 75 回日本生化学会大会発表抄録集 4P-246、1008、京都.
- 田之倉優、李愚哲、櫻井雅弘、Murphy, M. E. P.、善野修平、西郷薫 (2002. 10) ピロリ菌のニトロ還元酵素 RdxA の構造と機能. 日本バイオイメージング学会 第 11 回学術集会要旨集 A19、129-130、名古屋.
- 村松知成、小田佳史、湯本史明、伊藤三恵、田之倉優 (2002. 10) 真核生物ポリペプチド鎖終結因子 eRF1 の構造と終止コドン認識メカニズム. 日本バイオイメージング学会 第 11 回学術集会要旨集 P14、193-194、名古屋.
- 奈良雅之、森井尚之、湯本史明、鍵裕之、

田之倉優 (2002. 11) 赤外分光法によるカルシウム結合タンパク質と金属イオンとの相互作用の解析—合成カルシウム結合ペプチドによるアプローチ. 第40回日本生物物理学会年会講演予稿集 42巻、S63、名古屋.

湯本史明、永田宏次、足立恭子、根本暢明、尾島孝男、西田清義、大槻磐男田之倉優 (2002. 11) アカザラガイ閉殻筋トロポニン I フラグメントを結合したトロポニン CC 端ドメインの溶液構造解析. 第41回 NMR 討論会講演要旨集、198-199、東京.

小田佳史、伊藤三恵、山越智、永田宏次、山本健二、鈴木和男、田之倉 優(2002. 11) NMR および X 線による LECT2 の構造解析. 生体防御機能異常ワークショップ-2002-講演要旨集、3-4、京都.

Dawson, Wayne、伊藤三恵、山越智、山本健二、田之倉優、鈴木和男 (2002. 11) LECT2 の多型における MD シミュレーションによる構造変化の解析. 生体防御機能異常ワークショップ-2002-講演要旨集、3-5、京都.

Kato, Y., Ito, M., Kawai, K., Nagata, K., Tanokura, M. (2002. 11) Determinants of ligand specificity in groups I and IV WW domains. Program and Abstracts of the Fifteenth Annual and International Meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2002), S2-2, 16, Fuchu, Tokyo, Japan.

Tanokura, M., Suzuki, R., Nagata, K., Yumoto, F., Kawakami, M., Nemoto, N., Furutani, M., Adachi, K. and Maruyama, T. (2002. 12) Solution structure of an archaeal FKBP with a dual function of proline *cis-trans* isomerase and chaperone-like activities. Program and Abstracts of the 21st Century COE Program for Frontier in Fundamental Chemistry, The University of Tokyo – University Louis Pasteur Joint Symposium “Frontiers in Molecular Science” 29, Tokyo.

Kamo, M., Kudo, N., Lee, W. C., Motoshima, H., Tanokura, M. (2002. 12) Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of peptide deformylase from *Thermus thermophilus* HB8. Structural Biology & Functionnal Genomics Singapore.

Yumoto, F., Nagata, K., Adachi, K., Nemoto, N., Ojima, T., Nishita, K., Ohtsuki, I., Tanokura, M. (2002. 12) Solution structure of troponin C C-domain complexed with troponin I fragment from Akazara scallop striated muscle. Structural Biology & Functionnal Genomics Singapore.

Kudo, N., Yasumasu, S., Iuchi, I., Tanokura, M. (2002. 12) Crystal structure of HCE-1, hatching enzyme of Medaka, *Oryzias latipes*. Structural

Biology & Functionnal Genomics
Singapore.

田之倉優 (2002. 12) 生物マシーナリーの構造生物学. 日本結晶学会年会講演要旨集 2002、SB-II-01、12、東京.

加藤有介、伊藤三恵、河合勲二、永田宏次、田之倉優 (2002. 12) グループ IV WWドメインのリン酸リガンド認識機構とその決定要因について. 第 25 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集 W1aN-10、335、横浜.

Sadykov, M., Asami, Y., Niki, H., Handa, N., Itaya, M., Tanokura, M., Kobayashi, I. (2002. 12) Multiplication of a restriction modification gene complex. 第 25 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集 1P-0393、488、横浜.

村松知成、小田佳史、湯本史明、伊藤三恵、田之倉優 (2002. 12) 真核生物ポリペプチド鎖終結因子 Erf1 の構造と終止コドン認識メカニズム. 第 25 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集 1P-0619、526、横浜.

中村彰男、羽生田友紀、辛宏、三木直子、荻原哲、岩崎わかな、田之倉優、和田文孝、人見清隆、牧正敏、河野重行、小浜一弘 (2002. 12) 真性粘菌フィザルムの新規カルシウム結合蛋白質 CBP40 の自己集合と生理学的機能について. 第 25 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨

集 1P-0812、558、横浜.

丸岡慎太郎、澤野頼子、工藤紀雄、加藤有介、加茂昌之、櫻井雅弘、入本慶宣、湯本史明、本間康平、李愚哲、河原林裕、田之倉優 (2002. 12) 超好熱古細菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来 GMP synthetase の結晶構造解析. 第 25 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集 2P-0197、731、横浜.

澤野頼子、秦野賢一、村松知成、永田宏次、田之倉優 (2002. 12) パイナップル (*Ananas comosus*) 由来プロメラインインヒビターの構造機能相関の解析. 第 25 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集 2P-0198、731、横浜.

Dawson, W., Ito, M., Yamagoe, S., Yamamoto, K., Tanokura, M., Suzuki, K., (2002. 12) Polymorphism and changes in the structural stability of LECT2 as evidenced by molecular dynamics simulations. 第 25 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集 2P-0199、732、横浜.

工藤紀雄、安増茂樹、井内一郎、田之倉優 (2002. 12) メダカ孵化酵素 (HCE-1, HCE-2) の結晶化と立体構造解析. 第 25 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集 2P-0200、732、横浜.

小田佳史、伊藤三恵、山越智、山本健二、鈴木和男、田之倉優 (2002. 12) サイトカイン LECT2 の X 線結晶構造解析. 第 25 回

日本分子生物学会年会プログラム・講演
要旨集 2P-0201、732、横浜.

2) 実用新案登録	なし
3) その他	なし

伊東孝祐、中西雅之、李愚哲、善野修平、
西郷薫、北出幸夫、田之倉優 (2002. 12)
AzoR (AzoReductase) の結晶構造. 第 25 回
日本分子生物学会年会プログラム・講演
要旨集 2P-0202、732、横浜.

湯本史明、永田宏次、足立恭子、根本暢
明、尾島孝男、西田清義、大槻磐男田之
倉優 (2003. 1) アカザラガイ閉殻筋トロ
ポニン CC 端ドメインのトロポニン I ペプ
チド複合体の構造. 2003 年生体運動研究
合同班会議、福岡.

村上健次、湯本史明、大木進野、田之倉
優 (2003. 1) トロポニン TCI 複合体の NMR
による解析. 2003 年生体運動研究合同班
会議、福岡.

湯本史明、永田宏次、足立恭子、根本暢
明、尾島孝男、西田清義、大槻磐男田之
倉優 (2003. 1) アカザラガイ閉殻筋トロ
ポニン C-トロポニン I フラグメント複合
体の NMR 構造. 2003 筋生理の集い、慈恵
医大.

田之倉優 (2003. 2) NMR (核磁気共鳴) でタ
ンパク質のかたちと動きを見る. バイオ
イメージング「バイオイメージングとナ
ノテクノロジー」要旨集 3-6, 66-67、東
京.

G. 知的所有権の取得状況

1) 特許取得 なし