

血管炎症候群の病態の機能ゲノム解析と創薬探索技術の開発

所 属 国立成育医療センター研究所
研究者 阿部 淳

分担研究者

- (1) 国立成育医療センター研究所免疫アレルギー研究部 阿部 淳
(2) 日本製薬株式会社研究本部 西川 浩平

要 旨

川崎病急性期の末梢血単核球での遺伝子発現パターンを DNA-chip で解析した。またエルシニア菌由来スーパー抗原 YPM によりマウスにトキシックショックを誘導し、その機序を DNA-chip で解析した。T 細胞の組織リクルートと炎症性ケモカイン産生がショック誘導に重要であると考えられた。

1. 研究目的

原因不明の血管炎症候群の一つである川崎病は、5才未満の乳幼児に好発する急性熱性疾患である。日本では毎年約7千例が発症し、発症後1ヶ月の時点で全患者の約7%に冠動脈瘤などの心後遺症が発生する。川崎病の急性期治療としてはアスピリンの経口投与およびガンマグロブリン大量静注療法の有効性が確立しているが、その作用機序は未だ不明である。また治療不応例が少なからず存在するために、より有効な心後遺症の予防法の確立が望まれている。

川崎病をはじめとして血管炎症候群の疾患のいくつかは、抗好中球抗体や抗平滑筋抗体などの自己免疫が発症に関与すると考えられている。細菌感染や細菌由来物質との接触がその発症の端緒となる可能性もある。近年、スーパー抗原毒素などの分泌性蛋白や LPS、ペプチドグリカンなどの細菌細胞膜の構成分子、CpG モチーフをもつ細菌ゲノム由来の DNA などが、微生物特有のパターンを認識する Toll 様レセプター (TLR) などによって認識され、宿主の生体防御反応に関与することが明らかになった。これらの微生物由来物質は、TNF- α 、IL-1、IL-12 などの炎症性サイトカインの産生を通じて免疫系を賦活化する一方で、過剰反応によるトキシックショック症候群やトランスポールと呼ばれる免疫不応答を誘導することが知られている。

本研究では第一に、川崎病の急性期に末梢血中の単核球細胞に発現される遺伝子を DNA-chip を用いて網羅的に解析することにより、心血管障害に特異性の高い分子群を同定し、合わせて、ガンマグロブリン大量静注療法の作用機序を分子レベルで明らかにすることを目標とする。第二に、細菌由来物質による免疫細胞の機能修飾作用を in vivo および in vitro で解析するモデル実験系を立ち上げることで、第三に、DNA-chip を用いた機能ゲノム解析をこのようなモデル実験系に応用することにより、炎症性サイトカインや Th1 細胞の誘導、トランスポールの誘導に関わる細胞内シグナル伝達分子をはじめとする多様な遺伝子群の機能を明らかにすることを目標とする。これらの臨床的および基礎的な情報を統合、解析することにより、新しい治療薬、ワクチンなどの探索に役立てたい。

2. 研究方法

(1) DNA-chip解析

急性期の川崎病患者5名および健常成人5名の末梢血単核球からRNAを抽出し、標識cRNAを合成してAffimetrix社のGeneChip HG-U94Aを用いて発現量を測定した。また、マウス脾細胞からRNAを抽出し、標識cRNAを合成してAffimetrix社のGeneChip MG-U74Aを用いてmRNA発現量を測定した。測定結果を解析ソフト (GeneSpring, Silicon Genetics社) を用いてクラスター解析した。

(2) 末梢血 T細胞のアポトーシス感受性の解析

第2病日から第147病日の川崎病患者57名からヘパリン加静脈血を79検体採取した。採血管に入れたままで一晩室温に静置した後、単核球を遠心分離し、PerCP 標識抗 CD3 抗体および FITC 標

識 AnnexinV で二重染色（一部は抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体で三重染色）し、フローサイトメトリーで解析した。

（３）リコンビナントYPMの精製

wild-typeのYPM遺伝子を発現ベクターpMAL-p2-HisTagにクローニングし、大腸菌に遺伝子移入してリコンビナント蛋白を精製した (Ito, et al. Eur J Biochem 263:326-337, 1999)。

（４）実験動物およびYPMの投与

in vivoのモデル動物として、BALB/cマウス（6-8週齢、雄）を用いた。40mgのD-galactosamineを腹腔内注射した30分後に、wYPM 100 μ gを0.1mlのPBSに溶解して尾静脈内に注入した。対照マウスには、D-galactosamineの注射後にPBS 0.1mlを尾静脈内に注入した。

（５）病理組織学的検索

wYPMの投与12時間後にマウスを安楽死させ、肝臓、心臓、脾臓、腎臓を摘出してホルマリン固定後、H&E染色にて病理組織学的に観察した。

（６）免疫染色とフローサイトメトリー

抗マウスCD3-perCP抗体、抗マウスCD69-FITC抗体、抗T細胞抗原レセプターV β 4-PE抗体、V β 8-PE抗体はBD-PharMingen社から購入した。末梢血および脾臓、肝臓、腋窩リンパ節、腸間膜リンパ節から単核球細胞を分離し各抗体で免疫染色した後、混入したRBCを溶血してFACSscanおよび解析ソフト（CELLQuest, Becton Dickinson社）で解析した。

3. 研究成果

（１）川崎病急性期患者のDNAチップ解析

昨年度の研究では、同じ患者群から得られた結果（発現量, Ave-*r*age difference）を統計ソフト（StatView J-5.0）を用いて健常成人 19 名の結果と比較することにより有意差検定を行った。今年度は、患者群と対照群の数を同じにすること、また各 chip での発現量の中央値を基準にして DN A-chip 間の標準化を行うことを目的として市販の解析ソフト（GeneSpring, Cilicon Genetics 社）を利用して解析をすすめた。

その結果、急性期の発現が、健常成人と比較して 2 倍以上に増加した遺伝子が 69 個、2 分の 1 以下に減少した遺伝子が 244 個見出された。発現の増加した遺伝子を機能グループ別に分類した結果を表 1 に示した。

表 1. 川崎病急性期に発現が増加した遺伝子群

機 能	増加した遺伝子数
細胞間シグナル伝達	5
細胞表面分子	7
細胞内シグナル伝達	5
細胞周期・アポトーシス	8
代謝経路分子	6
転写因子	14
細胞骨格分子	4
その他	11
未知	9
合 計	69

増加した遺伝子の数は昨年度の 113 個と比べて減少したが、そのほとんどは、昨年度の解析結果でも有意差が認められたものであり両方の解析結果はよく一致していた。機能別では細胞間シグナル伝達（炎症性サイトカイン・ケモカイン）群が 5 個、細胞周期・アポトーシス群 8 個、細胞内シグナル伝達群 5 個、転写因子群 14 個など、多様なグループに分かれた。急性期に増加した遺伝子の中で、サイトカイン・ケモカイン関連遺伝子および細胞周期・アポトーシス関連遺伝子を表 2 に示す。サイトカイン・ケモカイン関連では、IL-8・EGF-like Growth Factor・Pre Bcell Enhancing Factor (PBEF)・MIP-2 α ・MIP-1 α の順に遺伝子発現の亢進がみられた。細胞周期・アポトーシス関連では、cyclin G related protein・G0S2・NOT・nur77・Bcl-X_L・Bfl-1 (A1)・gadd45 α ・A20 の 8 遺伝子が、健常成人と比べて有意に強く発現していた（表 2）。

次に、急性期に増加した遺伝子の中で、Bcl-X_L・Bfl-1 (A1)・A20 など抗アポトーシス機能をもつ遺伝子が、昨年と同様に多かったので、川崎病患者の末梢血 T 細胞のアポトーシス感受性について検討した。

（２）アポトーシス感受性の解析

第 2 病日から第 147 病日にかけてのさまざまな時期の川崎病患者 57 名からヘパリン化静脈血を 79 検体採取した。末梢血 T 細胞のアポトーシス感受性について、できるだけ ex vivo での刺激を避け

て観察するために、採血したヘパリン化静脈血をそのまま室温に静置し、約 16 時間後に単核球を分離して Annexin V 染色を行った。得られた検体を発症後の経過病日から、A 群（第 2 病日から第 4 病日）、B 群（第 5 病日から第 7 病日）、C 群（第 8 病日から第 11 病日）、D 群（第 12 病日から第 14 病日）、E 群（第 15 病日以降）、の 5 グループに分けて Annexin V 陽性 T 細胞の割合を比較した。

その結果、アポトーシス細胞の割合は発症早期の A 群では平均 13.3% と低値であるのに対して、B 群、C 群と経過日数が進むにつれて 18.8%、26.3% と徐々に増加すること、C 群を頂点として、それ以降の D 群、E 群では再び 19.7%、12.9% と徐々に減少することが明らかになった。このような、発症後の経過日数による T 細胞のアポトーシス感受性の変化が、免疫グロブリン大量静注療法による影響ではないかについて検討するために、第 5 病日から第 11 病日にかけて得られた検体を対象として、アポトーシス細胞の割合をグロブリン療法前後で比較した。その結果、グロブリン療法前の 9 例のアポトーシス細胞の割合は 16.8% だったのに対して、グロブリン療法後の 26 例でのアポトーシス細胞の割合は 30.9% であり、有意にアポトーシス感受性が増加していた。グロブリン療法前の検体の平均検査日が 5.6 日なのに対して、グロブリン療法後の検体の平均検査日は 9.3 日と有意に遅いため、発症後の経過日数による影響を否定できなかったが、グロブリン療法により末梢血 T 細胞のアポトーシス感受性が増加する可能性が示唆された。

(3) wYPM 静脈内投与マウスの病理組織学的検索

前年度の結果では、wYPM は静脈内投与すると BALB/c マウスに対して 85.7% (7 匹/8 匹中) の致死率を示した。死亡はいずれも投与後 24 時間以内であり、末梢血中の YPM 反応性 V β 8 陽性 T 細胞比率の急激な減少と血清中 IFN- γ 濃度の有意な上昇をともなっていた。そこで今年度は、wYPM の急性致死作用の機序についてさらに検討するために、wYPM 投与 12 時間後のマウスの肝臓、心臓、脾臓、腎臓の組織所見を対照の PBS 投与群と比較して、病理組織学的な検索を行った。YPM 投与後のマウスの肝臓では、広範囲に肝細胞壊死がみられた。肝細胞には細胞質の好酸性変化や脂肪性変化、細胞核のアポトーシス様分画化が認められた。門脈領域には炎症性細胞の浸潤が軽度に見られ、ヒトのトキシックショック症候群で報告されている肝臓の組織変化に類似していた。また脾臓では、白脾髄における細胞数の減少が、心臓では、右室の心外膜に広範囲の石灰化が認められた。腎臓では糸球体および尿管に有意の変化はみられなかった。検索した 4 つの臓器すべてで小動静脈内のうっ血像が著明であり、ショックによる循環障害が示唆された。

(4) YPM 静脈内投与後の T 細胞レパートリー変化の機序

昨年度の実験結果から、wYPM を静脈内投与した BALB/c マウスでは、0、2、4 時間後の末梢血中の YPM 反応性 V β 8 陽性 T 細胞の比率は、31.4%、18.0%、10.6% と急激に減少した。一方、スーパー抗原活性をもたない YPM 変異体を投与したマウスや、中和活性をもつ抗 YPM モノクローナル抗体を wYPM と同時に投与したマウスでは、このような YPM 反応性 V β 8 陽性 T 細胞の減少はみられず、また急性致死も生じなかったことから、末梢血中の V β 8 陽性 T 細胞の動態が急性ショックの誘導と深く結びついていることが推察された。そこで今年度は、wYPM 静注後の V β 8 陽性 T 細胞の比率を末梢血だけではなく脾臓、肝臓、腋窩リンパ節、腸間膜リンパ節の各臓器で調べた。その結果図 1 に示す通り、肝臓における 0、1、4 時間後の V β 8 陽性 T 細胞の比率は、27.9%、47.6%、

表 2. 川崎病急性期に発現が増加したサイトカイン・ケモカイン・アポトーシス遺伝子

遺伝子	GenBank entry	発現増加率 (倍)
＜サイトカイン・ケモカイン＞		
IL-8	M28130	29.1
EGF-like GF	M60278	15.5
PBEF	U02020	5.2
MIP-2 α	M36820	4.5
MIP-1 α	D90144	2.6
＜細胞周期・アポトーシス関連＞		
cyclin G related	U61836	251.2
G0S2	M69199	54.3
NOT	X75918	11.7
nur77	S77154	3.2
Bcl-X _L	Z23115	3.0
Bfl-1 (A1)	U27467	2.7
gadd45 α	M60974	2.6
A20	M59465	2.1

48.6%と末梢血における比率とは反対に急激に増加することが明らかになった。肝臓以外の臓器での V β 8 陽性 T 細胞の比率には、有意の変化はみられなかった。また、YPM に反応しない V β 4 陽性 T 細胞の比率は、末梢血中のみならず肝臓、腋窩リンパ節、腸間膜リンパ節のいずれの臓器においても有意の変動はみられなかった。T 細胞の活性化にともなって早期に細胞表面に表出される CD69 分子を同時に染色したところ、肝臓での T 細胞の CD69 陽性率は wYPM を静注した 1 時間後に 2.1%から 36.8%に増加していた。以上の結果から、wYPM 静注によって活性化された V β 8 陽性 T 細胞は、静注 1 時間後の早期から速やかに肝臓に移行することが示唆された。

(5) YPM 投与後の脾細胞における mRNA 発現の網羅的解析

YPM によって免疫細胞で誘導あるいは抑制される遺伝子を網羅的に解析するために、YPM 静注前、静注後 1、4、12 時間後の脾臓から T 細胞を分離して total RNA を抽出し、Affimetrix 社の GeneChip MG-U74A を用いて mRNA 発現量を測定した。測定結果を解析ソフトを用いてクラスター解析したところ、各々の測定時間に特異的に発現誘導される遺伝子が多数見出された。静注 1 時間後に発現が増加 (> 2.0) した遺伝子は 355 個あり、MIP-1、CCR7、ICAM-1 などのケモカイン・細胞接着分子、Bcl-2、Bcl-XL、FAS などのアポトーシス関連遺伝子、rel-B、c-jun、c-fos などの転写促進因子が含まれていた。静注 4 時間後に発現が増加 (> 2.0) した遺伝子は 327 個あり、IFN- γ 、IL-1 などのサイトカイン、B7-2、CD40 などの副刺激伝達分子が含まれていた。このうち多くの遺伝子は静注 4 時間以降 12 時間後まで発現亢進が持続したが、その中には STAT-1、IP-10、MIG、PKR などの IFN 反応性遺伝子や Granzyme A などの細胞傷害効果分子などが含まれていた。

静注 1 時間後に発現が増加 (> 2.0) した遺伝子は 355 個あり、MIP-1、CCR7、ICAM-1 などのケモカイン・細胞接着分子、Bcl-2、Bcl-XL、FAS などのアポトーシス関連遺伝子、rel-B、c-jun、c-fos などの転写促進因子が含まれていた。静注 4 時間後に発現が増加 (> 2.0) した遺伝子は 327 個あり、IFN- γ 、IL-1 などのサイトカイン、B7-2、CD40 などの副刺激伝達分子が含まれていた。このうち多くの遺伝子は静注 4 時間以降 12 時間後まで発現亢進が持続したが、その中には STAT-1、IP-10、MIG、PKR などの IFN 反応性遺伝子や Granzyme A などの細胞傷害効果分子などが含まれていた。

4. 考 察

原因不明の血管炎症候群のなかには、自己免疫の発症機構が予想されているものも多く、細菌感染や細菌由来物質との接触がその発症の端緒となることも考えられる。近年、スーパー抗原や LPS、ペプチドグリカン、細菌ゲノム由来の DNA や double strand RNA などが、各種の組織細胞上のレセプターによって認識され、宿主の生体防御反応に関与することが明らかになった。これらの微生物由来物質は、TNF- α 、IL-1、IL-12 などのサイトカイン産生を通じて炎症反応を惹起する一方で、過剰反応による shock 症候群や免疫交差反応、免疫不応答などの免疫異常の病態に関与することが知られている。

本研究では、血管炎症候群のなかでも川崎病に的を絞って、その急性期の免疫異常の病態を分子レベルで明らかにし、心血管障害の予防に繋げることを目標の一つにしている。川崎病の急性期には、血清中の IL-1、IL-6、TNF- α 、IL-8、MCP-1 などの炎症性サイトカイン・ケモカインの値が高く、免疫反応の亢進状態を示すと同時に、血管透過性の亢進作用や組織傷害作用を通じて、急性期の病態の主要な成因のひとつとなっていることがこれまでに明らかにされてきた。実際に、臨床症状の軽快とともに、これらのサイトカインは血中から速やかに消失すること、逆に、グロブリン療法などの治療にもかかわらず発熱が持続し冠動脈瘤を合併する症例では、これらのサイトカインの高値が持続することが示されている。昨年度は、急性期患者の末梢血単核球を対象として DNA-chip 解析を行い、発現が増加していた遺伝子 113 個を見出した。なかには IL-1、IL-6、TNF- α などの炎症性サイトカインの遺伝子が含まれていた。今年度は同じ患者群から得られた結果を、市販の解析ソフトウェアを用いて解析し、各 DNA-chip および各遺伝子における発現量の中央値を基準にして標準化することを試みた。その結果、患者群において発現が 2 倍以上に有意に亢進していた遺伝子の数は昨年度の 113 個から 69 個に減少したが、遺伝子機能別の分類では、炎症性サイトカインを始めとして細胞表面の

V β 8 / CD3 (%)

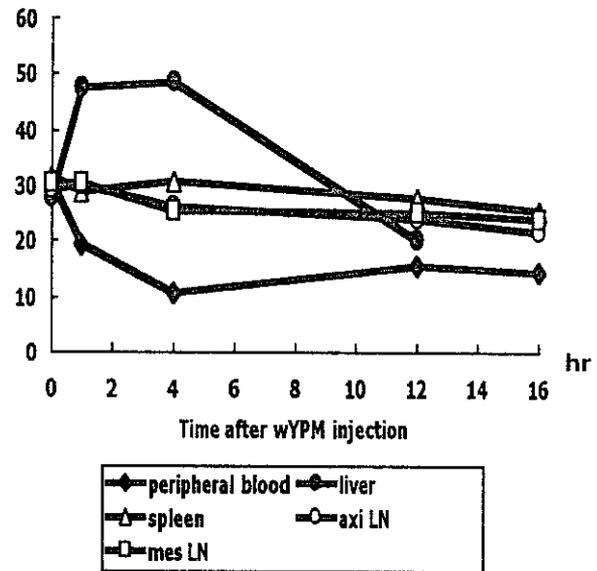


図 1. YPM 投与後の V β 8 陽性 T 細胞の変動

レセプター分子や細胞内シグナル伝達分子、転写因子など多様性に富む傾向に変わりはなかった。なかでも炎症性サイトカイン・ケモカインの比重は昨年度と同様に高く、MIP-1 α 、MIP-2 α といったケモカインが今回新たに加わった。IL-1 α 、IL-6、TNF- α については、今回有意差が得られなかったものの、患者群で高い傾向は続いていた。

これらの炎症性サイトカイン・ケモカインの産生亢進状態の原因のひとつとして、昨年度得られた結果から末梢血中の免疫細胞のアポトーシス抵抗性の増加が考えられた。すなわち、今年度のDNA-chip解析および昨年度のRT-PCRの結果から、Bcl-X_L、Bfl-1(A1)、FLIPといった抗アポトーシス遺伝子の発現量が急性期の患者群で高いことが明らかになった。これらの結果を機能面で確かめるために、末梢血T細胞のアポトーシス感受性について検討した。その結果、T細胞のアポトーシス感受性は発症後2-4日の早期には高くなく、発症後8日から11日をピークとして徐々に高くなることが分かった。グロブリン大量療法が抗アポトーシス遺伝子の発現を低下させる作用をもつかどうか、またどのようなシグナル伝達経路や転写因子を通じてこれらの遺伝子の発現を制御するのか、今後明らかにする予定である。

本研究のもう一つの目標は、細菌由来物質による免疫細胞の機能修飾作用の機序を分子レベルで明らかにし、血管炎症候群の病態と比較検討することである。本年度は昨年に引き続き、エルシニア菌由来スーパー抗原YPMによってマウスに誘導される急性ショックの機序を、(1)病理組織学的検索、(2)YPM反応性V β 8陽性T細胞の体内分布の解析、(3)脾臓におけるT細胞の遺伝子発現の網羅的解析の3つの方向から検討した。昨年度の研究結果から、YPMによるトキシックショック誘導にはT細胞が不可欠であり、致死作用の強弱はT細胞からのIFN- γ 産生を誘導する活性と相関することが示唆されたが、今年度の病理組織学的検索の結果、YPMによるトキシックショックの主たる病変の場は肝臓であること、また、wYPM静注1時間後の早期から、活性化されたV β 8陽性T細胞が速やかに肝臓に移行することが明らかになった。

SEBなどの黄色ブドウ球菌のスーパー抗原でも、スーパー抗原反応性T細胞が抗原刺激を受けて増殖を始める前に、その細胞数が一時的に減少することが、以前から報告されており、“early deletion”と呼ばれている。Wahlらはこの現象の機序として、アポトーシスによるT細胞の細胞死を推定している。しかし、われわれの今回の結果は、“early deletion”が生じる以前の静注1-2時間後からスーパー抗原反応性T細胞が末梢血中から消失する点で、これまでの報告とは異なっている。さらに、このT細胞の減少の原因は細胞死ではなくて、末梢血中から肝臓への活性化されたT細胞のリクルートによることも明らかになった。われわれの実験でも、静注12-16時間後には肝臓のみならず脾臓や二次性リンパ節においてもYPM反応性T細胞の比率は減少傾向にあったので、“early deletion”の現象自体を否定するものではないが、トキシックショック誘導の機序としては、今回見出されたT細胞の肝臓へのリクルートがより重要であると考えている。

脾臓における免疫細胞の遺伝子発現の網羅的解析の結果については未だ解析途中であり、より精細な解析結果を待たなければならないが、静注1時間後に発現が増加した遺伝子の中にMIP-1、CCR7、ICAM-1などのケモカイン・細胞接着分子やBcl-2、Bcl-X_L、FASなどのアポトーシス関連遺伝子が含まれていたことは、前記のショック誘導におけるT細胞リクルートの重要性を裏付けるものであると考えられる。また静注4時間以降に発現亢進する遺伝子中に多くのIFN反応性遺伝子が含まれていたが、これらの機能や発現制御機構に注目して今後の解析を進める予定である。

5. まとめ

- (1) 急性期川崎病患者の末梢血単核球での遺伝子発現をGeneChipおよび解析ソフトGeneSpringを用いて解析した。健常成人と比較して2倍以上に増加した遺伝子が69個、2分の1以下に減少した遺伝子が244個見出された。
- (2) 発現が増加していた遺伝子の中には、IL-8、MIP-1 α 、MIP-2 α などの炎症性ケモカインや、シグナル伝達分子、転写因子など、多様な機能を示す遺伝子群が含まれていた。
- (3) 川崎病発症後2-4日の早期には、Bcl-X_L、FLIPなどの抗アポトーシス作用をもつ遺伝子の発現が増加しており、末梢血中のT細胞もアポトーシスの誘導に対して抵抗を示した。このことは、川崎病の急性期に炎症性サイトカインの産生が持続する原因の一つと考えられた。

- (4) グロブリン大量静注療法の後、末梢血中のT細胞のアポトーシス感受性は増加した。これが、活性化後細胞死 (AICD) の機序によるものか、グロブリン療法自体がこのアポトーシス感受性の増加を促進する作用があるかについて、今後検討する予定である。
- (5) マウスにスーパー抗原 Y PM を投与して、トキシックショックを誘導する実験動物モデルを作成した (致死率 85.7%)。病理組織学的には、wYPM 投与群で、肝臓および脾臓のアポトーシスによる細胞壊死やうっ血、心外膜における石灰化を認めた。
- (6) YPM 静注 1 時間後の早期から、末梢血中の YPM 反応性 V β 8 陽性 T 細胞の比率は半減し、逆に肝臓での V β 8 陽性 T 細胞の比率は倍増した。
- (7) Affymetrix 社の U74A-DNA チップを用いた脾細胞の解析では、静注 1 時間後からケモカインやアポトーシス関連遺伝子の発現が増加し、4 時間以降には IFN- γ の発現や IFN 反応性遺伝子群の発現も増加した。この急性ショックモデルでは wYPM による T リンパ球刺激と肝臓へのリクルート、炎症の場でのケモカインや細胞傷害分子の産生が致死作用にとって最も重要と考えられた。

6. 研究発表

Abe J, Noma S, Nogami H, Nakajima H, Terai M. Expression of apoptosis inhibitor genes and resistance of T cells to apoptosis in the early acute phase of Kawasaki disease (Abstract). *Pediat. Res.* 53, 161(2003).

Abe J, Terai M, Nogami H, Toyoda Y, Nakajima H, Nakano T, Noma S. Colonization of the superantigen-producing *Staphylococcal aureus* among patients with Kawasaki disease (Abstract). *Pediat. Res.* 53, 168(2003).

Nomura I, Abe J, Saito H, Noma S, Leung DYM. Adrenomedullin mRNA is highly expressed in PBMC of acute Kawasaki syndrome. (Abstract). *Pediat. Res.* 53, 171(2003).