

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

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-難治-01)

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

鈴木 和 男

平成16（2004）年3月

目 次

I. 総括研究報告	
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	1
鈴木和男	
II. 分担研究報告	
1. 真菌分子誘導の血管炎モデルマウスの解析	15
鈴木和男	
2. 循環器疾患における遺伝子治療の基礎的検討 —特にラット自己免疫性心筋炎モデルを用いた心筋炎、心筋症に対する遺伝子治療の検討—	25
相澤義房	
3. 家族性地中海熱と遺伝子異常に関する研究	31
布井博幸	
4. 炎症における carboxypeptidase R(CPR)の役割に関する研究	43
岡田秀親	
5. 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	49
笹田昌孝	
6. 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：劇症肝炎とMOFでの制御性T細胞減少	53
木村暢宏	
7. 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	57
関塚永一	
8. 多臓器不全に関与するサイトカインモデルマウス	63
岩倉洋一郎	
9. CAWS誘発マウス動脈炎モデルにおける動脈炎形成過程の病理組織学的検討	67
高橋 啓	
10. MOF関連血管炎における血管内皮細胞の役割	71
増田弘毅	
11. 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	75
竹下誠一郎	
12. 多臓器不全因子(LECT2)の構造解析	83
田之倉優	
13. 肝機能不全症解析：LECT2ノックアウトマウス	87
山越 智	
14. ミエロペルオキシダーゼコード領域の日本人集団での変異に関する研究	91
亀岡洋祐	
15. 難治性血管炎における多臓器障害の病態経過と血中サイトカインの検討	99
武曾恵理	
16. ナノ粒子プローブによる多臓器不全の解析	111
山本健二	
17. 3次構造のシュミレーション解析によるLECT2多型の安定性の差	117
Wayne Dawson	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	119
IV. 研究成果の刊行物・別刷	127

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
総括研究報告書

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

主任研究者：所属施設：国立感染症研究所 室長

氏名：鈴木和男

分担研究者：所属施設：新潟大学大学院・医学研究科 教授

氏名：相澤義房

所属施設：名古屋市立大学・医学研究科 名誉教授、長寿医学研究所 所長

氏名：岡田秀親

所属施設：宮崎大学・医学部 教授

氏名：布井博幸

所属施設：京都大学 教授

氏名：笹田昌孝

所属施設：福岡大学・医学部 講師

氏名：木村暢宏

所属施設：国立埼玉病院 副院長

氏名：関塚永一

所属施設：北野病院・腎臓内科 部長

氏名：武曾恵理

所属施設：東京大学医科学研究所 教授

氏名：岩倉洋一郎

所属施設：国立感染症研究所 主任研究官

氏名：亀岡洋祐

所属施設：国立感染症研究所 主任研究官

氏名：山越 智

所属施設：東邦大学・医学部 助教授

氏名：高橋 啓

所属施設：国立国際医療センター研究所 部長

氏名：山本健二

所属施設：東京大学大学院 教授

氏名：田之倉優

所属施設：静岡県立大学 教授

氏名：竹下誠一郎

所属施設：秋田大学 教授

氏名：増田弘毅

所属施設：国立感染症研究所 技術補助員

氏名：Wayne Dawson

研究要旨

急激に発症し致命的である多臓器不全は、加齢だけでも全身的な臓器機能異常の準備状態をきたし、若年者でも全身の血管炎やリウマチ・膠原病でも同様な異常がみられる難治性血管炎に関連した疾患が、腎、肺、肝機能、腎不全の発症と好中球の活性化を契機に多臓器不全へ進展すると推定される。この多臓器不全化を阻止する方法の確立には、病態の解析に加え、難治性血管炎や多臓器不全に関連する疾患モデルの開発が必要であった。本研究事業では、これらの病態に関与する LECT2 や、IL-1Ra などのサイトカインや、補体関連分子の遺伝子のノックアウトマウスの作製を推進し、病態の解明と治療法を検討した。さらに、これらの機能不全にかかわる遺伝子、免疫、補体、血球、凝固、循環に関する集学的な解析から、臨床と基礎研究の融合を図った。

(1) 臨床研究：われわれが発見したサイトカイン LECT2 は、肝疾患症例で肝炎症反応抑制と回復に関与している可能性を明らかにし、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を示唆した。また、多臓器に発症した血管炎の死亡した症例の病態および 15 症例の臓器障害度と血中のサイトカインを含む炎症パラメーターの動向が著名であった。一方、血管炎の川崎病では、冠動脈病変に好中球が産生するエラスターゼが関与していることが示唆され、エラスターゼ阻害作用を有するプロテアーゼ阻害剤が治療薬として期待される。さらに、TCR 多様性低下/オリゴクローン性 T 細胞出現、NKT 細胞の欠如・増加、制御性 T 細胞の欠如・低下が影響し免疫過剰状態となり、MOF へ陥ることが示唆された。ところで、遺伝子解析により日本に珍しい家族性地中海熱症を経験し、pyrin という初期免疫に関わる蛋白変異と多臓器不全との関係が示唆された。マロリーワイズ症候群 1 症例に MPO 完全欠損を見出し、遺伝子変異解析により新たなミスセンス点突然変異を見出した。本症例ではエクソン 4 に位置し、アミノ酸配列の位置としては L 鎖と H 鎖の切断点の近傍の L 鎖側シート構造に位置し、MPO のプロセッシングに影響を与えていることが示唆された。

(2) モデル動物・プローブの開発：種々の遺伝子欠損マウスを作製し、血管炎関連の多臓器不全の解析へに有用性を確認した。正常骨髄細胞を IL-1Ra 欠損マウスに移植することにより、発症を抑制できたことから、T 細胞依存性の免疫応答が発症への関与を認めた。また、LECT2 ノックアウトマウスにおいて、NKT 細胞の増加が ConA 肝炎重篤化の原因の一つであることを示唆した。さらに、ProCPR 遺伝子をノックアウトしたマウス (ProCPR^{-/-}) を創生し、ProCPR^{-/-} マウスに LPS により半数のマウスが死亡したことより、CPR が炎症反応の制御に生体内でも役割を果たしていると解釈した。一方、*Candida albicans* Water Soluble fractions (CAWS) 誘導の血管炎マウスでは、CAWS 投与初期には、好中球が血中に一過的動員され活性化状態にあることがわかった。CAWS CAWS 接種後 1 日には既に内膜炎が生じていた。その後、外膜側の炎症細胞浸潤が加わり、7 日目には汎血管炎に至った。汎血管炎は当初、限局性の微小な病変であるが、やがて病変は拡大し 28 日目には個体差の少ない肉芽腫性病変が形成された。そして、臨床応用をめざし、ラット自己免疫性心筋炎のモデル動物により遺伝子治療を行い、サイトカインや免疫関連遺伝子 (IL-10、CTLA-4-IgG、SLPI-IgG、IL-13-IgG、IL-1 受容体アンタゴニスト-IgG) プラスミドを遺伝子導入し有用性を確認した。

(3) 発症機構解析：血管炎にかかわる多臓器不全分子の構造、評価法、発症機序について解析した。LECT2 の NMR を用いた高次構造解析については、主鎖のスペクトル帰属を完了し、二次構造情報まで得

られている。X線結晶構造解析については、より良い分解能のデータを得ることができた。尾静脈から注入された蛍光ナノプローブとして量子ドット標識化リンパ球系株化細胞は、導入後5日間、血管中に存在し、7日後には消失する事を観測した。また、好中球自己抗体の関与を明らかにするため、抗マウスMPO抗体の投与により、腎血管の傷害が進行し、近尿細管からデキストランが流出した。これには、好中球アポトーシスが関与していることが示唆された。また、血管炎発症にいたる血管内皮細胞のかかわりを明らかにする目的で、家兎総頸動脈動静脈吻合実験モデルを用いこの血流増大による動脈の内皮細胞の細胞回転の著しい増大が骨髄からの幹細胞を介したものであることを明らかにした。

A. 研究目的

多臓器不全は、白血球の再活性化で急激に発症してくる病態であり致命的である。加齢だけでも全身的な臓器機能異常がもたらされ、多臓器不全の準備状態をきたし、若年者でも全身の血管炎やリウマチ・膠原病では同様な異常が想定できる。これらの難治性血管炎に関連した疾患が、腎、肺、肝機能、腎不全の発症と好中球の活性化を契機に多臓器不全へ進展すると推定される。この多臓器不全化を阻止する方法を確立するには、まず、難治性血管炎や多臓器不全に関連する疾患モデルの開発が必要である。また、これらの病態に関与するLECT2や、IL-1 α などのサイトカインや、補体関連分子の遺伝子のノックアウトマウスを作製することが重要である。また、これらの動物による病態の解明が不可欠である。さらに、これらの機能不全にかかわる遺伝子、免疫、補体、血球、凝固、循環にかかわる集学的な解明も必須である。

多臓器不全では各臓器機能障害への血管傷害の関与はきわめて大きい。劇症の肝傷害は、IFN γ やIL-1、IL-6など炎症性サイトカイン、補体系、凝固線溶系、白血球の活性化を通して、血管傷害を誘発し、肺、腎、心臓などの多臓器を標的臓器として傷害をもたらす。そこで、多臓器不全にいたる各種因子・遺伝子ノックアウトマウスを初め、疾患モデルマウスを利用して多臓器不全化機構について検討することが重要である。一方、主任者らが進めてきた難治性血管炎は、しばしば重篤な多臓器不全への移行がみられ、難治性血管炎からの移行の解析もきわめて重要な要因を占めていることから、血管炎との関係を重視する。

本研究の最終目的は、難治性血管炎と連動する多臓器不全の病態解析、遺伝的背景の解明による新たな治療法の開発にある。多臓器不全のモデルを用いた病態解析や治療法の開発をめざし、免疫不全状態や白血球の活性化・アポトーシスの機構解析や補体の活性化のかかわりなどを多面的から検討し、診断・治療に利用可能な診断プローブやイメージングを含めた解析法を開発することである。特に、われわれが開発中のin vivoイメージング法による生きた状態での多臓器不全への急激な移行過程を解析することも重要である。これらの基礎研究—臨床研究の綿密な連携による融合研究により、難治性血管炎と連動する多臓器不全新たな治療法を開発して、トランスレーショナルリサーチへの準備を確立することにある。

B. 研究方法

各因子の解析および遺伝子改変動物は、分子生物学、生化学的手法によった。また、動物の病態解析は、サイトカイン発現など分子生物学的、免疫学的、病理学的、バイオイメージングにより解析した。さらに、患者の治療は、各科の評価法により効果を判定した。

倫理面への配慮：多臓器不全を伴う疾患について、特に本人あるいは、家族にインフォームドコンセントをもらい、因子の解析を行った。また、動物実験においては、各施設のガイドラインに沿って承諾のもとに動物愛護の観点から研究した。

各項目の方法は、簡略して以下に示す。詳細は、分担者報告に記載。

(1) 臨床研究

- 1) 多臓器不全を巻き込む腎炎、心筋炎、動脈炎の解析
- 2) 周産期・新生児での低酸素性虚血性脳症における治療法の開発
- 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

(2) モデル動物・プローブの開発、病態解析

- 1) 多臓器不全に関する各種サイトカインモデルマウス
- 2) LECT2 ノックアウトマウス
- 3) ProCPR 遺伝子ノックアウトマウス
- 4) 動脈炎惹起起因子・染色体マッピング、内皮細胞の動的解析
- 5) ナノ粒子による多臓器不全の解析
- 6) 多臓器不全因子の構造解析

(3-1) 発症機構解析解明：病態発症機構の分子的・遺伝的解析と測定方法

- 1) 血管炎関連の多臓器不全の誘発モデルと *in vivo* イメージングによる血管傷害過程の解析
- 2) 炎症における carboxypeptidase R(CPR)の役割
- 3) 好中球機能亢進と好中球アポトーシスの遅延
- 4) 新規好中球遊走サイトカイン LECT2 の劇症肝炎へ関与

(3-2) 多臓器不全因子のヒトの遺伝的背景の解析

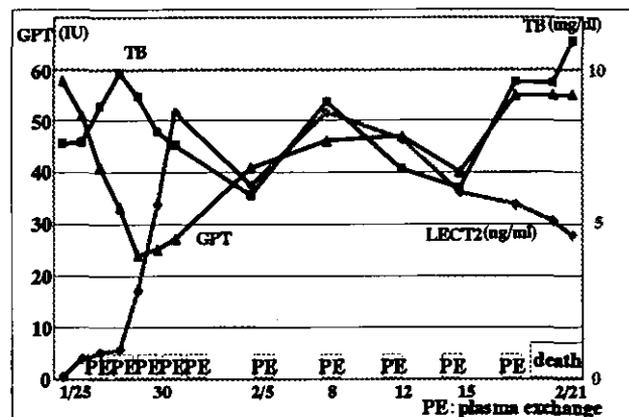
- 1) 多臓器不全の発症機構における T 細胞抗原受容体 (TCR) 多様性
- 2) 血管炎発症に関与する Myeloperoxidase(MPO) のコード領域の日本人集団での変異

C. 結果

(1) 臨床研究：

1) 新規好中球遊走サイトカイン LECT2 の劇症肝炎への関連：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)。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 γ -GPT に有意差をもった若干の相関が見出された。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 1) 劇症肝炎 48 歳女性

2) 難治性血管炎における多臓器障害の病態経過と血中サイトカインの検討：サイトカイン測定による病態の解析：15 例の患者の背景一年齢は平均 72 歳 (57 - 83 歳)、男性 9 名、女性 6 名であった。全例が臨床診断は血尿を主体とした尿所見と腎機能低下を伴う急速進行性糸球体腎炎像を呈した。血管炎患者 12 例における治療開始前の血清あるいは血漿でサイトカインを測定したところ、血漿 TNF- α , IL-6, IL-10 は健常者 12 例にくらべ、有意に高値を示した。血漿 IL-8 は、血管炎患者で極端に高値を示す例が認められ、血清 IL-12, IL-18 は血管炎患者において健常者に比べ有意に高値であった。TNF と IL-10、IL-6 と IL-8、IL-6 と WBC、IL-8 と WBC、IL-18 と CRP の間に有意な正の相関を認めた (それぞれ $P < 0.05$, 0.0001, 0.01, 0.01)。腎限局型 4 例と多臓器障害型 11 例における違いを検討したところ、臨床的重症度を比較する BVAS は多臓器障害方で優位に高値であった。一方、MPO-ANCA は多臓器障害型において、腎限局型に比べ高値の傾向があった。

3) 川崎病における血管炎の病態解明と治療法の検討：TNF- α で刺激された好中球を、種々のサイトカインで刺激された HUVEC に添加した結果、

TNF- α +IFN- γ で刺激された HUVEC において、最大の EC 障害が得られた。次いで、活性化好中球を介する内皮細胞傷害に対するプロテアーゼ阻害剤の抑制効果種々のプロテアーゼ阻害剤 UTI、SSH と nimesulide(エラスターゼの特異的拮抗剤)が、EC 障害を抑制したが、gabexate mesilate、nafamostat mesilate、aprotinin、argatroban は抑制しなかった。UTI や SSH は、好中球細胞内に産生されたエラスターゼの活性を抑制することが判明した。

4) 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: VAHS では Foxp3 発現は全般に低い傾向で、一部発現の欠如例も認められた。それら欠如例の多くが死亡し、悪性度との相関が示唆された。MOF や準備状態で Foxp3 発現の欠如・減少傾向を認めた。劇症肝炎を含む肝炎後再生不良性貧血で、肝臓機能の最重症例で Foxp3 発現の欠如を認め、寛解とともに Foxp3 発現回復をみた。この regulatory T 細胞の動きは NK T 細胞と相関した。分類不能型免疫不全症(CVID)の一例で、Foxp3 発現の欠如を認めた。

5) 家族性地中海熱と遺伝子異常: 経過については、分担研究報告参照。遺伝子解析の結果地中海熱と診断し、特異的な治療薬として知られるコルヒチンを 1.5 mg/day から使用した。その後は一旦解熱したものの、再び、発熱を認めたため、2mg/day に増量し、現在は解熱状態が保れた。FMEFV 遺伝子に P369S 変異がヘテロの変異として確認された。この変異は、すでに 1 例報告されており、この変異が病因であることが確定された。

6) ミエロペルオキシダーゼコード領域の日本人集団での変異: MPO 完全欠損である Type I を示し、好中球画分を用いたウエスタンブロット解析では正常 heavy subunit および light subunit は検出できず、正常ペプチド以外のサイズを示す複数のペプチドが検出された。cDNA フラグメントの塩基配列解析から点突然変異 (A465G、A523G、C1338T) を見出した。いずれの変異もホモであることが確認された。

(2) モデル動物・プローブの開発

1) 多臓器不全に関与するサイトカインモデルマウス: IL-1Ra 欠損マウスの骨髓細胞を放射線照射した野生型マウスに移植したところ、24 週後に 7 匹中 5 匹に血管炎が発症した。一方、野生型マウスの骨髓細胞を IL-1Ra 欠損マウスに移植した場合は、発症が 6 匹中 2 匹に抑えられ、発症の程度も軽かった。この結果、骨髓由来細胞が発症に関与していることが示された。又、正常骨髓移植によって、発症が抑制された。また、IL-1Ra 欠損マウスの T 細胞をヌードマウスに移植したところ、13 匹中 12 匹が血管炎を発症した。この結果、T 細胞が発症で主要な役割を果たしていることがわかった。

2) 肝機能不全症解析: LECT2 ノックアウトマウス: LECT2-KO マウスにおける肝 NKT 細胞の解析—LECT2-KO マウスの肝臓 mononuclear cells(MNC)画分の CD3int NK1.1⁺細胞の割合は、野生型に比べて約 2 倍の有した。LECT2-KO マウスの α -GalCer 投与により産生される 2 時間後の IFN- γ は、野生型と差がなかったが、IL-4 産生は約 2 倍多く誘導された。また、Con A 炎モデルにおいて、処理 5 時間後の血中 GPT の活性と肝臓の DNA 断片化は野生型では変化が認められなかったが LECT2-KO マウスではすでに GPT の上昇が観察され、組織染色において重篤化が認められた。LECT2-KO マウスでは、処理後 1 時間という極めて初期に、NKT 細胞が産生する IL-4 が発現量の倍増が見られ、IL-4 血清レベルも 2 倍の差が見られた。LECT2-KO マウスでは FasL の発現の亢進、アポトーシスになった NKT 細胞の割合の増加により Con A 肝炎の感受性が亢進されたと考えられた。

3) 炎症における carboxypeptidase R(CPR)の役割に関する研究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。しかし、Pep-A を Crry に対する抗体を投与する 30 分前に投与しておいたときには救命効果を示さなかった。また、Pep-A の N 末をアセチル化した AcPep-A は抑制作用を示した。マウスにカンチダアルピカンスの水溶性抽出物 (CAWS) を静脈内に投与するとショック死を起こす大野博士ら (東京薬科大学) の系に Pep-A を前投与してもショック死を抑える作用は極めて弱かったが、AcPep-A を投与するとショック死を Pep-A よりも強く抑えることができた。ProCPR 欠損マウス (ProCPR^{-/-}) を作製し、そのマウスに LPS を投与した翌日に生体内の補体を協力的に活性化する Cobra Venom Factor (CVF) を静脈内に投与すると半数ほどのマウスは重篤なショック状態に陥り死亡した。これに対し、欠損のない野生型マウスやヘテロのマウスはショック状態を惹起しなかったため、ProCPR の欠損がショック病態の誘起に密接に関連していると考えられた。ProCPR から活性化された CPR が生体内での炎症ペプチドの不活性化に重要な役割を果たしていることを示していると考えられた。

4) CAWS 誘導血管炎の動態: 1) CAWS によって、CADs 同様、冠状動脈炎が誘導された。冠状動脈炎の頻度は、DBA/2 で 100% 近い値を示した。冠状動脈炎の程度は、DBA/2, C57BL/6, C3H/HeN の順であり、CBA/2 は冠状動脈炎がほとんど検出されなかった。2) CAWS 誘導の各種系統マウスの脾臓を CAWS の種々の濃度で刺激し、産生されたサイトカインを測定した。その結果、冠状動脈炎の程度と連動して、炎症性サイトカイン TNF α 産生は、DBA/2 で高値を示した。血管炎誘導モデルにおいては、これらのサイトカインは CAWS 誘導の冠状

動脈炎との相関が認められたことから、本モデルにおける冠状動脈炎発生抑制には複数の遺伝子の関与が考えられた。少なくとも 3 個の染色体上に抑制遺伝子がマッピングされた。具体的には、真菌由来分子によって誘導されるサイトカイン産生と活性化好中球に重要な役割を担っているものと考えられる遺伝子群は、Chr-1, Chr-4 は誘導遺伝子、Chr-4 は抑制性の 3 箇所の候補部位があがった。

5) CAWS 誘導血管炎の経時的推移: Stage I: 大動脈における炎症性変化の内、最も初期の変化は、内膜における炎症細胞浸潤 (内膜炎) であった。これらは CAWS 接種後 1 日目のマウスで既に観察された。Stage II: 上記変化に加えて外膜の炎症細胞浸潤 (外膜炎) が加わった。外膜炎は 3 日目から観察され、5 日目ではより明瞭となっていた。Stage III: 血管壁全層におよぶ炎症 (汎血管炎) は 7 日目から観察された。初期の汎血管炎病巣は、微小で好中球が主体であったが、経時的に病変は拡大し増殖性炎の像を呈するようになった。

6) 循環器疾患における遺伝子治療の基礎的検討
特にラット自己免疫性心筋炎モデルを用いた心筋炎、心筋症に対する遺伝子治療の検討: IL-10、CTLA-4-IgG、SLPI-IgG、IL-13-IgG、IL-1 受容体アンタゴニスト-IgG を組み込んだ naked DNA プラスミドによる遺伝子治療で、EAM は発症を抑えた。pCAGGS-CTLA4-Ig をもちいた遺伝子導入による EAM 抑制効果。CTLA4-Ig 治療により、心臓の心筋炎病変面積率は、コントロールの pCAGGS を投与した群に比べて、有意に減少した。pCAGGS-IL-13-Ig をもちいた遺伝子導入による EAM 抑制効果。IL-13-Ig 治療により、心臓の心筋炎病変面積率は、コントロールの pCAGGS-Ig を投与した群に比べて、有意に減少した。遺伝子の種類により発現蛋白血中濃度の推移がかなり異なり、中でも IL-13-IgG、CTLA4-IgG の治療では、ほとんど発症していないラットもあった。一方、T 細胞、および心臓から非心筋非炎症性細胞培養に、IL-1 受容体アンタゴニスト-IgG 治療ラット

の血清を添加し、その細胞の免疫関連蛋白遺伝子の発現の変化を検討したところ、培養T細胞では、治療血清の添加により、IL-2やINF- γ などのTh1サイトカインの発現低下がみられ、培養した非心筋非炎症性細胞では、治療血清の添加により、PGE2遺伝子発現の有意な低下がみられ、EAMの発症を抑えた可能性が示唆された。

(3) 発症機構解析

1) 多臓器不全因子(LECT2)の立体構造解析：¹H-¹⁵N HSQC, HNCA, HN(CO)CA, HNCACB, CBCA(CO)NH等のスペクトルを用いて主鎖の帰属を行った結果、観測可能と期待される130スピン系(140アミノ酸残基 - (N末端残基 + Pro残基9個))のうち110について帰属を完了した。そこで、化学シフトの値についてBioMagResBank(BMRB)に登録を行った。また、2つの条件で得られた結晶についてX線回折強度測定を行い、それぞれ、分解能1.9Åのデータセット、空間群： $P4_12_12$ あるいは $P4_32_12$ 、格子定数： $a = b = 63.2 \text{ \AA}$, $c = 59.8 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ 、および分解能1.7Åのデータセットが得られ、空間群： $P2_12_12_1$ 、格子定数： $a = 58.7 \text{ \AA}$, $b = 59.6 \text{ \AA}$, $c = 63.4 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ が得られた。

2) ナノ粒子プローブによる多臓器不全の解析：半導体ナノ粒子を導入した細胞を、マウス生体内に導入し、その生体内動態を、解析した。マウスリンパ球系株化細胞(EL4)に、赤色半導体ナノ粒子(Cd/Se; 蛍光波長560nm)を導入した。細胞をマウスに投与し、導入した細胞の97%は、末梢血管内に存在したが、5日後には、38%、7日後には、32%、10日後には、14%となった。その後、大部分は、肺に存在し、その他は、脾臓に存在し、肝臓や腎臓には、ほとんど存在しなかった。

3) 血管炎発症機構のin vivoイメージング—MPO-ANCAの関与—：血管炎や腎炎でのMPO-ANCAの役割を明らかにするために、血管炎モデルマウスを開発し、MPO-ANCAに関連した発症機構を

In-vivo Imagingにより検討し、血管傷害初期のMPO-ANCAと好中球の関与について検討した。血管傷害による近尿細管への血液成分の流出—MPO-ANCAによって血管傷害が引き起こされ、腎炎が誘発された。その初期機構をin-vivoイメージングにより解析した。蛍光標識した分子で、通常血管外には漏れ出さないものを投与して血管傷害に引き続き誘発される腎炎の障害を近尿細管への漏出で検出した。anti-mouse MPOの投与によって、RITC-dextranが近尿細管に流出することが観察された。

4) 好中球機能亢進と好中球アポトーシスの遅延：分離した正常好中球をTNF α によりアポトーシスを誘導すると、時間とともにXIAPが消失した。この変化は、in vitroで μ , mカルパインとともにリコンビナントXIAPを直接切断することから、XIAPの消失にカルパインの関与する可能性が考えられた。また、好中球をカルベプテンで前処理すると、TNF α 誘導アポトーシスは抑制された。これはカスパーゼによるXIAP切断に先立ってカルパインによる切断が認められたことから、好中球に恒常的に存在するカルパイン活性がXIAPを徐々に切断してカスパーゼ3阻害能を減弱させ、アポトーシス刺激によるカスパーゼ3の活性化を促進している可能性が示された。

5) MOF関連血管炎における血管内皮細胞の役割：DiI陽性の内皮細胞の出現が血流増大家兎総頸動脈に認められ、骨髄の細胞が動脈に遊走する可能性を明らかに出来た。BrdUでラベルの内皮細胞を追跡することにより、内皮細胞が血流増大後約1.25日から1.5日に家兎総頸動脈にあらわれることから、骨髄からの遊走が血流増大家兎総頸動脈で生じている可能性を示した。

D. 考察

(1) 臨床研究

急性肝炎：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 γ -GTP に有意差をもった若干の相関が見出された。

MPO-ANCA 関連血管炎：MPO-ANCA 関連血管炎患者 12 例での血中サイトカインは TNF- α 、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18 の有意な上昇を認め、その病態に高サイトカイン血症が関与していると考えられた。TNF- α は ANCA 関連血管炎症候群において、好中球のプライミングに重要であることが多数の報告で示されている。また、流血中でプライミングされた好中球は apoptosis に陥りやすく、本研究での結果では患者血漿 IL-8 は健常人と比べ優位な上昇ではなかったが、患者の中には極端に IL-8 高値を示すものも認められた。Savage らは ANCA 関連血管炎患者の腎組織を用いて、In situ hybridization と免疫組織化学により腎系球体と半月体における IL-8 を証明していることより、障害臓器部位などの局所で病態に関与しているサイトカインの存在も示唆された。血管炎による臓器障害が多いほど治療が困難になることもしばしばであり、今回、15 例の血管炎患者のうち、多臓器障害型血管炎 11 例と腎限局型血管炎 4 例においてその違いを検討したところ、MPO-ANCA 値が多臓器障害型で高い傾向があった。

好中球活性化による血管内皮細胞傷害と MOF：好中球は、炎症性疾患において組織障害を引き起し EC は好中球の初期の重要なターゲットになりうる。multiple organ failure (MOF) において、活性化された好中球は EC 傷害を引き起こす。活性化好中球を介する EC 傷害は、好中球が産生する活性酸素やプロテアーゼによって引き起こされる。今回の in vitro の実験の結果、プロテアーゼ阻害剤の UTI 及び SSH と特異的なエラスターゼ

拮抗剤である nimesulide は、活性化好中球を介する内皮細胞傷害を抑制したが、他のプロテアーゼ阻害剤 (gabexate mesilate, nafamostat mesilate, aprotinin, argatroban) は抑制することはできなかった。好中球エラスターゼは、活性化好中球を介する EC 傷害に対して最も重要な働きを果たすと考えられている。以上の所見から、UTI と SSH は、好中球が産生するエラスターゼを不活化することによって、EC 傷害を抑制すると考えられる。

MOF の危険因子としての制御性 T 細胞著減：MOF では高サイトカイン状態とされているが、これまでに制御性 T 細胞著減の報告は、我々以外に見ない。MOF での免疫不全状態は多様な面もあり、恒常的に制御性 T 細胞著減が存在するか、今後多くの症例を検討する必要がある。制御性 T 細胞著減が MOF の危険因子と成りうるのかも検討の必要性あり。今後の制御性 T 細胞療法を目標とした。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)、慢性活動性 EBV 感染症、ウイルス関連血球貪食症候群 (VAHS) 症例に対象を広げ、制御性 T 細胞を比較検討する。リアルタイム PCR によるより正確な Foxp3 発現量の比較、細胞各分画に分けた分析、Th1/Th2 サイトカインや炎症性サイトカインの分析も加え、免疫制御に NK T 細胞や制御性 T 細胞 (T-reg) がどのように関与しているかより詳細に検討すると共に、in vitro T-reg 増殖法の開発と制御性 T 細胞療法を試みる。

多臓器不全の家族性地中海熱、インフルエンザ脳症：今回検討した症例は、tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome (TRAPS), familial Mediterranean fever (家族性地中海熱：FMF) を疑い、臨床像および pyrin domain の遺伝子変異から、家族性地中海熱と診断した。E148Q, P369S, and K695R 変異の浸透率は各変異によってまちまちで、E148Q は 28% (11/3

2)、P369S は8% (2/32) といわれている。両変異の遺伝子スクリーニングでは無症状のホモの E148Q と P369S 変異を持つ健康保因者がいたことが確認されている。このことから、遺伝子変異だけでは診断根拠にならず、環境による疾病利得があるのだらうと議論されている。C5a 不活化酵素の低下と pyrin の関係を elastase は elastase inhibitor との関係で明らかにする。また、インフルエンザ脳症における何らかの遺伝子異常の関与を検討する予定である。

MPO 完全欠損：日本人集団に特異的な変異を明らかにしてきているが、今回、日本人では4例目の点突然変異による MPO 欠損例を解析した。今回、同定された変異 T175A においてもホモ接合体であり、変異位置が軽鎖ペプチドの N 末端近く、シグナルペプチドと軽鎖ペプチドの切断点に近く、premature なペプチドがプロセッシングを受ける際に何らかの障害が生じるものと考えられる。この部位の変異が MPO タンパクのプロセッシングに重要であることが示唆された。MPO タンパクプロセッシングの異常により生ずる不機能性の MPO ペプチドが MPO-ANCA の不規則的抗原として血管炎発症のトリガーとなっている可能性もあり、MPO 遺伝子の変異について全身性炎症、血管炎発症との関連において観察を進める必要があるもと考えられた。

(2) モデル動物・プローブの開発

IL-1Ra 欠損マウス：IL-1Ra 欠損マウスの骨髓細胞を放射線照射した野生型マウスに移植し7匹中5匹に血管炎が発症し、野生型マウスの骨髓細胞を IL-1Ra 欠損マウスに移植した場合は、発症が6匹中2匹に抑えられ発症の程度も軽かったことから、骨髓由来細胞が発症に関与していることが示された。また、IL-1Ra 欠損マウスの T 細胞をヌードマウスに移植により T 細胞が発症で主要な役割を果たしていることがわかった。

LECT2 欠損マウス：LECT2 ノックアウトマウスにおいて肝 NKT 細胞の増加が見られ、IL-4 の産生の

増加につながりそれが Con A 肝炎の感受性上昇の原因であることがわかった。LECT2-KO マウスで NKT 細胞の増加が見られたことより、LECT2 が NKT 細胞の肝臓での恒常性維持に重要な役割をしており、しかもそれが抑制的に働いていることを示唆した。

ProCPR 欠損マウス：作製した ProCPR ノックアウトマウスは、LPS で感作した後 CVF で強力な補体活性化を起こさせると過度の炎症反応により死亡するまうすが出ることは、CPR が生体内での炎症制御に役割を果たしていることを明示する結果と考えられる。更に、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。また、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。

CAWS 誘導冠状動脈炎：*Candida albicans* 由来糖ペプチドにより冠状動脈炎が誘発される。その誘発には、好中球殺菌酵素 MPO およびその自己抗体 MPO-ANCA の産生が発症誘導に不可欠であることをわれわれは明らかにしてきている。CAWS などの真菌由来分子が炎症性サイトカインを誘導し、それと連動する好中球の活性化が重要な役割を担っているものと考えられる。本モデルマウスは、今回主としておこなった CAWS の実験の他にも CADS の接種によって誘発される冠状動脈炎を発症するモデルマウスとして、Murata らが作製している。本動脈炎誘発モデルマウスでは、増殖性肉芽腫性炎を冠状動脈に高率に惹起させることが可能であり、病変の組織像および分布の類似性から川崎病動脈炎モデルとして考えられている。本モデルマウスは、カンジダ菌体抽出物をマウス腹腔内に接種することにより系統的動脈炎を惹起させる。一方、マウス系統により発症頻度に差が認められている。この発症の原因に MPO と MPO-ANCA にあるのではないかと考え、MPO 遺伝子

欠損マウスを用いて血管炎発症と好中球抗体 MPO-ANCA の誘導との関係を調べ、MPO が主たる要因になっていることをすでに報告した。その系統差を利用した染色体マップから今回 3 箇所の候補部位があがった。一方、本マウスにおける動脈炎形成に至る経時的組織変化を経時的変化に観察した結果、本実験系を用いた薬剤による血管炎抑制効果を評価するためには、初期病変である炎症細胞が内膜に限局する時期、すなわち CAWS 接種終了直後に薬剤が投与される必要がある。さらに、組織学的評価を客観的に行うためには接種後 28 日目の病変を観察するのが最も適当と考えられた。しかしながら、その一方で、接種後 14 日あるいは 28 日を経てもなお、血管壁に炎症細胞浸潤をみない個体や内膜に限局した炎症に留まる個体が存在した。このことは、起炎物質に感受性を示さない、あるいは内膜病変は惹起されるがその後汎血管炎へ進展せずに治癒に至る個体が存在することを示唆している可能性がある。

循環器疾患における遺伝子治療の基礎的検討—特にラット自己免疫性心筋炎モデル： EAM に対して、*in vivo* エレクトロポレーションを併用した筋肉注射法または hydrodynamics 法の遺伝子治療で、IL-10、CTLA-4-IgG、SLPI-IgG、IL-13-IgG、IL-1 受容体アンタゴニスト-IgG などが有効であることが判明した。また、遺伝子治療で発現するあらゆる蛋白の血中濃度を測定できる方法を確立したことにより、今後、他のより有効な遺伝子治療の可能性が容易に検討できると考えられた。これからの医療に、ゲノム創薬は、大きな期待が寄せられている。今回用いた naked プラスミド DNA の遺伝子治療は、よりよいゲノム創薬を検討する上で、低コストかつ簡便なことから、有用な方法になるのではないと思われる。医療費の高騰は、今後大きな社会問題であるが、この方法による有効薬の検討は、低コストでかつ簡便に行うことができことから、蛋白製剤の新薬開発にも、有用な手段となる可能性がある。また、naked プラスミド DNA の遺伝子治療が、臨床にそのまま応用でき

るようになれば、ウイルスを用いた遺伝子治療に比べて、副作用が少ないと予測され、かつ蛋白を精製し投与するよりも、簡便で、大量に作れることから、薬価もかなり抑えることができるのではないと思われる。今後、さらなる安全性の確立、よりよい投与方法の検討が必要ではあるが、応用範囲は益々広がる可能性があると考えられる。

(3) 発症機構解析

半導体ナノ粒子プローブ：半導体ナノ粒子はまた、表面加工により様々な機能を賦与することが可能である。そこで、生体に安全な半導体ナノ粒子を開発し、開発した半導体ナノ粒子に様々な薬剤を結合させ、薬物動態を半導体ナノ粒子の可視光観察によって細胞・組織・臓器・生体レベルで解析する事は国際的に極めて重要である。また量子ドットにより特定細胞に標識しその標識された細胞を正常マウスに導入する事によりその生体内動態を明らかにしホストとの相互作用を見る事により、血管炎による多臓器不全について解析する事は、国民医療における難病を克服する事は、社会的にも意義が大きいと考える。

血管炎発症機構の *in vivo* イメージング—MPO-ANCA の関与—：血管炎モデルマウスおよび臨床研究の結果から、MPO および MPO-ANCA 産生が血管炎の発症誘導に不可欠であること、また、炎症性サイトカインが血管炎の発症に連動し、特に、TNF- α 、IL-6、IL-10 が重要であることが明らかになってきている。このことは、これらサイトカインに連動した MPO と MPO-ANCA がこれらサイトカインと連動してこの発症の原因になっていることが強く示唆されている。さらに、これらサイトカインおよび MPO-ANCA は好中球を活性化する際にも重要な役割を担っているものと考えられている (NDT, *in press*)。

以上のように、*in vitro* での解析に加え、本年度の *in-vivo* imaging の研究により、MPO-ANCA が好中球と連動あるいは直接に血管傷害を引き起こし、腎機能障害をおこしていることを明らかに

した。

好中球機能亢進と好中球アポトーシスの遅延：好中球アポトーシスのシグナル伝達系にカスパーゼは中心的な位置を占める。アポトーシスを誘導する代表的な因子、TNF α のシグナル導入に始まり、カスパーゼ8を介してカスパーゼ3が活性化される。このカスパーゼ3に対してXIAPは抑制的に働き、さらにXIAPに対してカルパインが分解作用を発揮することを明らかにした。即ちカルパインは恒常的に好中球内においてXIAPを分解し、好中球のアポトーシスに対して促進的に作用すると考えられる。なお最近の報告によってカスパーゼがカルパインインヒビターに対して分解作用を発揮することが明らかにされ、カルパインとカスパーゼのcross-talkは好中球アポトーシス抑制に重要な位置を占めると考えられる。

動脈内皮細胞の由来：骨髄細胞が動脈内皮細胞に遊走することを証明できた。しかもこの遊走細胞が4-5回の細胞分裂をとおして爆発的に増殖することがあきらかとなり、この増殖パターンがTransit Amplifying細胞と極めて類似していることがわかった。したがって動脈内皮細胞の回転はいわゆる幹細胞システムの一環であることが推測された。つまり粥状硬化症、動脈瘤、動脈炎のすべての病態の基礎は我々が示したダイナミックな細胞回転の上になりたっていることになり、現在の動脈リモデリングの研究にあたらしい光りを与えることになるであろう。動脈のもう一つの細胞成分である平滑筋細胞に関しても同様なダイナミックな細胞回転を示すと考えられる。これにより動脈のリモデリングの解明ができると考えている。これまで動脈炎と考えられていた病態が、急速で著しい動脈リモデリングである可能性もあるのではないかと示唆するものである。

E. 結論

多臓器不全にいたる過程の解析や治療法の開発を検討した。全身性の血管炎の傷害機構の解析、劇症化機転・修飾にかかわる炎症細胞機能、因

子・分子の機能解析、分子機構に基づいた治療法の開発をめざした。「発症機構の基礎研究」—「モデル動物解析」—「病態解析」—「治療の検討」と分担者の研究が緊密に連携し、難治性血管炎から多臓器不全にいたる病態解析とその評価方法の確立、および治療法の開発の準備ができた。

(1) 臨床研究

1) **新規好中球遊走サイトカインLECT2の劇症肝炎への関連：**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。

2) **難治性血管炎における多臓器障害の病態経過と血中サイトカインの検討：**多臓器を巻き込むMPO-ANCA関連腎炎・血管炎においてその病態に高サイトカイン血症が存在し、好中球機能、ANCA産生などの病態に複雑に関与している可能性が示唆された。

3) **川崎病における血管炎の病態解明と治療法の検討：**UTIやSSHは、活性化好中球が介する内皮細胞傷害を抑制し、細胞外エラスターゼを不活化するだけではなく、好中球に直接作用して細胞内のエラスターゼ活性を抑制した。KD急性期の新しい治療薬として、UTIとSSHは有効である可能性が示唆された。

4) **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：**多臓器不全MOFが、過剰免疫状態であり、免疫をコントロールするとされるNKT細胞の欠如・増加、制御性T細胞の著減により引き起こされることが示唆されている。

5) **家族性地中海熱と遺伝子異常：**遺伝子解析の結果地中海熱と診断し、特異的な治療薬として知られるコルヒチンを1.5 mg/dayから使用した。その後は一旦解熱したものの、再び、発熱を認めため、2mg/dayに増量し、現在は解熱状態が保れた。FMEFV遺伝子にP369S変異がヘテロの変異

として確認された。この変異は、すでに1例報告されており、この変異が病因であることが確定された。

6) ミエロペルオキシダーゼコード領域の日本人集団での変異：異常なMPOペプチドを産生する変異の存在頻度は無視できるほど低いものではなく、MPO遺伝子全体のコード領域を考えるとさらに高い頻度でMPO遺伝子に何らかの変異を持つことが考えられる。その変異がMPO-ANCA発症へ関与している可能性は十分考えられることから、臨床対応においてMPO遺伝子変異の有無についての情報を考慮することが重要であると考えられた。

(2) モデル動物・プローブの開発

1) 多臓器不全に關与するサイトカインモデルマウス：IL-1Ra欠損マウスのT細胞を移植すると血管炎を発症することから、T依存性の免疫反応が発症に關与していることが示された。また、正常骨髄細胞の移植により、発症が強く抑制されたことから、骨髄移植が血管炎の治療に有効であることが示唆された。

2) 肝機能不全症解析：LECT2ノックアウトマウス：LECT2-KOマウスでは、肝臓NKT細胞の増加が観察され、その結果肝臓でのNKT細胞の活性の亢進が見られた。また、ヒトのウイルス性肝炎、自己免疫性肝炎モデルとして知られるCon A誘導性肝炎では増加したNKT細胞によるIL-4の過剰産生、さらにはNKT細胞の過剰活性化につながり、それが同肝炎モデルの重篤化の原因であることが示唆された。以上の結果からLECT2が肝臓NKT細胞の恒常性維持に關わり抑制的に働いている可能性が示唆された。

3) 炎症におけるcarboxypeptidase R(CPR)の役割：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Pep-Aを開発することができた。更にN末をアセチル化したAcPep-Aはより強い炎症抑制作用があると考えられる。これらが多臓器不全、DIC、敗血症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作用もある。ProCPRの遺伝子をノックアウトしたマウスも作成し、生体内でのCPRの重要性を明示することもできた。

4) CAWS誘導血管炎発症モデル：CAWS誘発マウス動脈炎モデルにおける血管炎形成過程を組織学的に検討した。血管病変は内膜炎として始まり、その後外膜炎が加わる。そして血管の内外両側から炎症細胞が浸潤し汎血管炎に至ることが明らかとなった。また、染色体マップからChr-1, Chr-4は誘導遺伝子、Chr-4は抑制性の遺伝子として、3箇所候補部位があがった。

5) 循環器疾患關連—ラット自己免疫性心筋炎モデルを用いた心筋炎、心筋症に対する遺伝子治療の検討：プラスミドのhydrodynamics法によるEAMの遺伝子治療で、IL-10、IL-13-IgG、CTLA4-IgG、IL-1受容体アンタゴニスト-IgG、SLPI-IgGなどが効果的な治療となりうることを示された。この方法は、簡単かつ低コストに検討することができ、他の疾患を含めた難治性疾患の新薬の開発の研究に、今でも有力な方法になりうると思われる。今後は新たな候補となる蛋白薬剤の検討と同時に、カテーテルを用いた局所にだけ発現できるようなヒトにも応用できる遺伝子治療法の開発が望まれる。

(3) 発症機構解析

1) 多臓器不全因子(LECT2)の立体構造解析：NMRとX線結晶構造解析という2種類の手法を用いてLECT2の高次構造解析を行った。また構造は決定できていないものの、NMRでは主鎖の帰属が完了して二次構造情報が得られ、X線結晶構造解析では結晶が得られてnativeデータの測定を完了した状態である。今後、構造解析を進めていく事によって慢性関節リウマチの原因解明に繋げていきたいと考えている。

2) ナノ粒子プローブによる多臓器不全の解析：半導体ナノ粒子によって標識された細胞を用いて、マウス生体内における、細胞動態解析に応用することが可能である事が判明した。量子ドットは、極めて特徴的な性質を有するため、血管炎による多臓器不全のメカニズムを解明するため蛍光ナノプローブを用いて自己免疫疾患のモデルマウスの免疫細胞に標識し、その標識された特定細胞を、正常のマウス血管に導入しその生体内動態を解析し、疾患メカニズムを明らかにするなどの生物・医療において今後の展開に向けての素地が築かれたと言える。

3) 血管炎発症機構の *in vivo* イメージング—MPO-ANCA の関与—：血管炎や腎炎での MPO-ANCA の役割を明らかにするために、血管炎モデルマウスを開発し、MPO-ANCA に関連した発症機構を *In-vivo* Imaging により検討し、血管傷害初期の MPO-ANCA と好中球の関与について検討した。

4) 好中球機能亢進と好中球アポトーシスの遅延：血管炎の病態形成に好中球の機能亢進が重要な役割を果たし得ると考え、好中球の機能亢進機序の 1 つとして、アポトーシス遅延に着目した。これまでの検討から、炎症性サイトカインの 1 つ、GM-CSF による好中球アポトーシス抑制につき明らかにしてきた。さらに今回好中球アポトーシスの機序として、一部明らかにした。このような所見は血管炎の治療の観点からも有用な所見となる可能性が考えられた。

5) MOF 関連血管炎における血管内皮細胞の役割：動脈の内皮細胞の細胞回転の一部があきらかになった。それは骨髄末梢血動脈をつなげるダイナミックな細胞増殖であった。このことは動脈の種々の病態である粥状動脈硬化症、動脈瘤および動脈炎の理解の基礎となるものであり、動脈病変に多くの示唆をあたえてくれるであろう。

以上、各班プロジェクトが順調に達成できた。

1) 因子としての特定と治療薬への準備ができたこと、特に C5a 阻害ペプチドは敗血症や多臓器不全などの重篤な患者を救命する有用な薬剤とし

て期待できるので、トランスレーショナルリサーチへのプロジェクトを申請できる段階に至っている。2) 各種ノックアウトマウスや、病態モデルを開発し、治療法の開発に利用できるようになった。3) 病態イメージング評価用のプローブが開発できた。4) 臨床病態の解析が進展した。多臓器不全は、過剰免疫状態であり、NKT 細胞の欠如・増加、制御性 T 細胞の著減により引き起こされることが示唆された。また、治療については、多臓器を巻き込む病態の治療法を開発している。人心筋炎での病態と重症度との炎症性サイトカインの役割を確認でき、モデルラットの解析から、炎症を引き起こす免疫細胞とサイトカインの役割が経時的に明らかにでき、炎症を抑制する物質が同定できた。このような炎症の抑制・修飾は MOF への移行を食い止める点からも重要である。

多臓器を巻き込む予後不良の ANCA 関連腎炎・血管炎における安全な治療法の検討は、急務であり、国際会議での発表で高い評価を受けた。各種サイトカインのノックアウトマウスや ProCPR 遺伝子ノックアウトマウスは CPR の解析に有用な実験動物であることから、欧米一流誌に掲載されている。CPR は炎症制御と共に線溶阻害にかかわる酵素であり、関連 C5a 阻害ペプチドは肺血症や多臓器不全の治療薬に実用化できると期待され、米国ミシガン大 Ward 教授らから評価を受けた。また、多臓器不全の本班の研究は、海外の研究者から、これからの研究方向として評価を得ている。

今後は、これまでの成果をベースに、1) 難治性血管炎から多臓器不全化機構の解明、2) 血管炎の多様性と多臓器不全への移行の制御、3) 感染により誘発される血管炎・多臓器不全と病態の関係因子の特定、4) 発症・病態関連遺伝子網羅的解析とその特定、5) サイトカイン・免疫系のかく乱機構の解析、6) 評価法・診断法と治療法を進展させる。「結果」に示した各因子とその阻害ペプチドなど選定されたマーカの病態評価への利用と、トランスレーショナルリサーチに向けた治療開発へむけて進展させる。

F. 健康危険情報

各分担研究報告書参照

G. 研究発表

各分担研究報告書参照

H. 知的財産権の出願・登録状況

各分担研究報告書参照

真菌由来分子によって誘導される血管炎の動態解析

主任研究者（分担研究）： 鈴木 和男 国立感染症研究所 生物活性物質部 室長

研究要旨：難治性血管炎の解析のために、真菌感染に由来分子によって誘導されるモデルマウスについて検討してきた。とりわけ、われわれは、真菌由来分子によって誘導される好中球自己抗体（anti-neutrophil cytoplasmic antibodies: ANCA）が、難治性血管炎の病態に相関していることを明らかにした。また、*C. albicans* 由来分子の glycoprotein CADS/CAWS が血管炎を誘導する。その誘導にはマウスの系統差があることを示した。CADS/CAWS での誘導にかかわるサイトカインや好中球の活性化を検討し、TNF α 、IL-6 および IL-10 の関与を認めた。また、CAWS 投与初期には、好中球が血中に一過的動員され活性化状態にあることがわかった。そこで、生体内での MPO 抗体の傷害を調べるために、抗マウス MPO 抗体をマウスに i.v.投与して血管障害について in-vivo imaging (IVI)により調べた。傷害のマーカープローブとして蛍光標識されたデキストランを用い、その漏出を解析した。その結果、抗マウス MPO 抗体の投与により、腎血管の傷害が進行し、近尿細管からデキストランが流出した。この現象は、別途行った *in vitro* での糸球体由来の血管内皮細胞に抗マウス MPO 抗体を投与した際に観察された adhesion molecules の発現増加に呼応していると思われる。さらに、誘導の系統差を利用して遺伝子マップ解析も行った。

A. 研究目的

多臓器不全は、腎、肺、肝機能、腎不全の発症と好中球の活性化を契機に多臓器不全へ進展すると推定される。この多臓器不全化を阻止する方法を確立するには、まず、難治性血管炎や多臓器不全に関連する疾患モデルの開発が必要である。真菌由来分子によって引き起こされる好中球顆粒内殺菌酵素の不全が、重篤な免疫不全の誘発や、自己抗体の産生に関与するなど、難治性血管炎の発症およびその要因になっていることをモデルマウスの解析から示してきた。*C. albicans* derived substances (CADS/CAWS) の接種によって冠状動脈炎を発症するモデルマウスにおいて、血管炎発症にともない、好中球抗体 MPO-ANCA が誘

導される。この MPO-ANCA 上昇には、MPO が関与してことを MPO ノックアウトマウス (MPO-KO) に CADS を接種して証明した。また、好中球殺菌酵素の不全が、重篤な免疫不全の誘発や、自己抗体産生性の難治性血管炎の発症に関与することが強く示唆されている。とりわけ、好中球自己抗体 ANCA が病態に相関していることを明らかにした (Inflammation 2001)。そこで、本研究では、*C. albicans* 由来分子の glycoprotein CADS/CAWS が血管炎を誘導するが、マウスの系統差があることに注目し、CADS/CAWS 誘導に反応する遺伝子群を特定することにした。CADS/CAWS による誘導でのサイトカイン産生におけるマウスの系統差および好中球の機能を解析した。また誘導の際のマ

ウスの系統差を利用して遺伝子マップ解析もあわせて検討した。さらに、生体でのMPO-ANCAの役割をin-vivo imagingにより解析し、血管傷害初期の様子を観察した。

B. 研究方法

1) 血管炎モデルマウスの調整：本疾患モデルは、川崎病リスクの冠状動脈炎発症モデルとして作られ、罹患児糞便から分離した*C. albicans*由来物質(CADSおよびCAWS)により誘導した。

2) In vivo イメージング：C57BL/6 マウス(オス、9週齢)にanti-mMPOを投与した、腎臓からの分子の漏出をIn vivo イメージングにより観察した。血流の可視化にはRhodamin-Dextranを用い、各マウス尿細管周囲毛細血管の血流および近尿細管からの分子の移動を観察した。

倫理面への配慮：多臓器不全を伴う疾患について、特に本人あるいは、家族にインフォームドコンセントをもらい、因子の解析を行った。また、動物実験においては、各施設のガイドラインに沿って承諾のもとに動物愛護の観点から研究した。

C. 結果

1) CAWSによって冠状動脈炎が誘導され、その頻度は、DBA/2で100%近い値を示した。
2) CAWS誘導の各種系統マウスの脾臓をCAWSの種々の濃度で刺激し、産生されたサ

イトカインを測定した。その結果、冠状動脈炎の程度と連動して、炎症性サイトカインTNF α 産生は、DBA/2で高値を示した(図1)。一方、他の炎症性サイトカインも同様の結果を示した。しかし、抗炎症性サイトカインIL-10はそれとは逆の結果を示した。

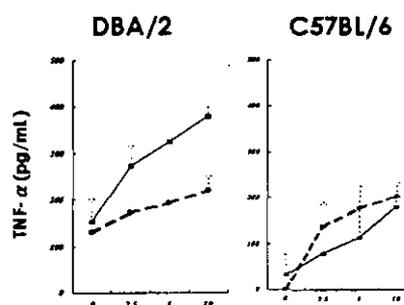


図1. CAWSによるTNF α 産生の亢進

実線：脾臓をCAWSで刺激

点線：PBS刺激のcontrol

2) 冠状動脈炎は、増殖性肉芽腫性炎の像を呈した。個体間で明らかな組織学的差異は見出せなかった。一方、サイトカインの誘導は、マウス系統によって異なり、顕著にあらわれたサイトカインは、Interferon- γ , TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10であった。血管炎誘導モデルにおいては、これらのサイトカインはCAWS誘導の冠状動脈炎との相関が認められた。このことから、本モデルにおける冠状動脈炎発生抑制には複数の遺伝子の関与が考えられ、サイトカイン産生と活性化好中球に重要な役割を担っているものと考えられる遺伝子群は、Chr-1,

Chr-4 は誘導遺伝子、Chr-4 は抑制性の 3 箇所
の候補部位があがった。

4) 血管炎発症機構の in vivo イメージング—MPO-ANCA の関与—：血管炎や腎炎での MPO-ANCA の役割を明らかにするために、血管炎モデルマウスを開発し、MPO-ANCA に関連した発症機構を In-vivo Imaging により検討し、血管傷害初期の MPO-ANCA と好中球の関与について検討した。血管傷害による近尿細管への血液成分の流出—MPO-ANCA によって血管傷害が引き起こされ、腎炎が誘発された。その初期機構を in-vivo イメージングにより解析した。蛍光標識した分子で、通常血管外には漏れ出さないものを投与して血管傷害に引き続き誘発される腎炎の障害を近尿細管への漏出で検出した。anti-mouse MPO の投与によって、RITC-dextran が近尿細管に流出することが観察された (図 2)。

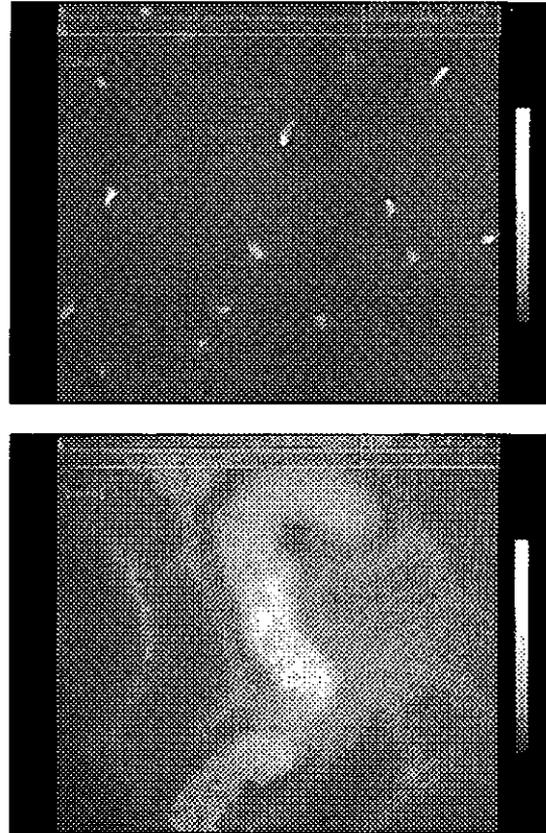


図 2. 近尿細管へのデキストラン分子の流出

Rhodamine B isothiocyanate (RITC)-
conjugated Dextran (RITC-dextran: mol wt
73,000)

コントロールとして用いた MPO 抗体を含まない IgG の投与では、観察されなかった。in vivo イメージングの解析により、血流速度の低下、血流停止、血液の逆流も観察され、腎表面血流の停止や血管内皮への白血球の接着についても観察された。

D. 考察

CAWS 誘導冠状動脈炎：*Candida albicans* 由来糖ペプチドにより冠状動脈炎が誘発される。その誘発には、好中球殺菌酵素 MPO およびその自己抗体 MPO-ANCA の産生が発症誘導に不可欠であることをわれわれは明らかにしてきている。CAWS などの真菌由来分子が炎症性サイトカインを誘導し、それと連動する好中球の活性化が重要な役割を担っているものと考えられる。本モデルマウスは、カンジダ菌体抽出物をマウス腹腔内に接種することにより系統的動脈炎を惹起させる。一方、マウス系統により発症頻度に差が認められている。この発症の原因に MPO と MPO-ANCA にあるのではないかと考え、MPO 遺伝子欠損マウスを用いて血管炎発症と好中球抗体 MPO-ANCA の誘導との関係を調べ、MPO が主たる要因になっていることをすでに報告した。その系統差を利用した染色体マップから今回 3 箇所の候補部位があがった。

血管炎発症機構の *in vivo* イメージング—MPO-ANCA の関与—：血管炎モデルマウスおよび臨床研究の結果から、MPO および MPO-ANCA 産生が血管炎の発症誘導に不可欠であること、また、炎症性サイトカインが血管炎の発症に連動し、特に、TNF- α 、IL-6、IL-10 が重要であることが明らかになってきている。このことは、これらサイトカインに連動した MPO と MPO-ANCA がこれらサイトカインと連動してこの発症の原因にな

っていることが強く示唆されている。さらに、これらサイトカインおよび MPO-ANCA は好中球を活性化する際にも重要な役割を担っているものと考えられている (NDT, *in press*)。

以上のように、*in vitro*での解析に加え、本年度の *in-vivo* imaging の研究により、MPO-ANCA が好中球と連動あるいは直接に血管傷害を引き起こし、腎機能障害をおこしていることを明らかにした。

2) 系球体血管内皮細胞の傷害と関連する adhesion molecules の発現：

一方、マウス系球体の血管内皮細胞の primary culture による血管内皮細胞の傷害を *in vitro*で解析した結果、コントロールの MPO 抗体を含まない IgG の投与では、その発現の変化が認められないインテグリン、セレクチンなどの adhesion molecules が、anti-mouse MPO の投与によって、その発現が増加した。この現象は、好中球を介し、あるいは直接、血管内皮細胞に MPO 抗体が作用していることが考えられる。以上のことから、図 3 の Scheme に示すように MPO-ANCA が好中球を活性化し、なおかつ直接系球体の血管内皮細胞に作用して adhesion molecules を発現させ、再度好中球を活性化している可能性がある。