

図3. MPO-ANCA による血管内皮細胞の障害の Scheme。E. 結論

真菌感染に由来する分子などによって、腎炎、SLE をはじめとする難治性血管炎が誘導される。とりわけ、カンジダ菌由来分子が血管炎を誘導し、難治性血管炎の病態マーカーである好中球自己抗体 ANCA も病態と連動した。

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 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。*Candida albicans* 由来糖ペプチドが、発症誘導に不可欠で、サイトカインと連動する活性化好中球が重要な役割を担っているものと考えられる。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。

本研究は、大川原明子、長尾朋和、越尾修、亀岡洋祐（以上—国立感染症研）、直江史郎、高橋啓、大原関利章（以上—東邦大・医）、大野尚仁、三浦典子（以上—東京薬大）、中山俊憲、長谷川明洋（以上—千葉大・院医）の諸先生方の協力により行なわれた研究をもとに記載した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

(1)誌上発表

1. Akiko Ishida-Okawara, T. Ito-Ihara, Eri Muso, Takahiko Ono, Kan Saiga, Kyuichi Nemoto, Kazuo Suzuki. Neutrophil contribution to the crescentic glomerulonephritis in SCG/Kj mice. *Nephrology, Dialysis*

- and Transplantation, 2004 in press
2. Hoshino, A., Hanaki, K., Suzuki, K. and Yamamoto, K., Applications of T-lymphoma labeled with fluorescent quantum dots to cell tracing markers in mouse body, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 314: 46-53, 2004.
 3. Ohashi, Y.Y., Kameoka, Y., Persad, A.S., Kohi, F., Yamagoe, S., Hashimoto, K., and Suzuki, K.. Novel missense mutation found in Japanese patient with myeloperoxidase deficiency. *Gene* in press.
 4. Ichimori, K., Fukuyama, N., Nakazawa, H., Aratani, Y., Koyama, H., Takizawa, S., Kameoka, Y., Ishida-Okawara, A., Kohi, F., and Suzuki, K.. Myeloperoxidase has directly-opposed effects on nitration reaction - Study on myeloperoxidase-deficient patient and myeloperoxidase-knockout mice. *Free Radical Research* 37: 481-489, 2003.
 5. Murata, K., Inami, M., Kubo, S., Kimura, M, Yamashita, M., Hosokawa, H., Nagao, T., Suzuki, K., Hashimoto, K., Shinkai, H., Koseki, H., Taniguchi, M., Ziegler, S.F., H., Nakayama, T. CD69-null mice protected from arthritis induced with anti-type-II collagen antibodies. *Int. Immunol.* 15: 987-992, 2003.
 6. Nunoi, H., Kohi, F., Kajiwar, H., Suzuki, K. Prevalence of Inherited Myeloperoxidase Deficiency in Japan. *Microbiol Immunol.* 47: 527-531, 2003.
 7. Sakamoto, M., Hasegawa, A., Sugaya K., Hashimoto, K., Kimura, M., Yamashita, M., Suzuki, K., Nakayama, T. Distinct calcium response induced by T-cell antigen receptor stimulation in thymocytes and mature T cells. *Bioimages* 11: 1-8, 2003.
 8. Suzuki, K. Neutrophil functions of patients with MPO-ANCA-related vasculitis *Internal Med.* 42: 552-553, 2003.
 9. Kamei, K., Sano, A, Kikuchi, K., Makimura, K., Niimi, K., Suzuki, K., Uehara, Y., Okabe N., Nishimura, K., Miyaji, M. The trend of imported mycoses in Japan. *J. Infect. Chemother.* 9: 16-20, 2003.
 10. Mie Ito, Oda, Yamagoe S. Suzuki K, Tanokura, M. Expression, oxidative refolding and characterization of six-histidine-tagged recombinant human LECT2, a 16 kDa chemotactic protein with three disulfide bonds. *Protein Expression Purif.* 27: 272-278, 2003.
 11. 鈴木和男 血管炎をめぐる世界の動き 「医学のあゆみ」206:123-126, 2003
 12. 鈴木和男 血管炎発症機構の解析研究—活性化好中球の関与「医学のあゆみ」206:133-139, 2003
 13. 鈴木和男 ANCA 関連血管炎の発症機序—活性化好中球の関与—リウマチ科 29:228-236, 2003.
 14. 大川原明子、鈴木和男、猪原登志子、小野孝彦、武曾恵理、雑賀 寛、根本久一：半月体形成性腎炎モデルとしての SCG/Kj マウスの好中球機能 *Pharma Medica* 21: 157-161, 2003.
- (2)学会発表
1. Kazuo Suzuki Seminar in the Department of Biochemistry, Cornell University, Medical School (New York City, USA). "Role of activated neutrophils in vasculitis development: in-vivo imaging", June 6, 2003, New York City, USA.
 2. Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., Dinauer, M.C., Maeda, N., and Koyama, H. "Critical role of myeloperoxidase and nicotineamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase in

- high-burden systemic infection of mice with *Candida albicans*." Gordon Research Conferences, June 8-13, 2003, New London, USA.
3. Kazuo Suzuki "Role of activated neutrophils in vasculitis development". Gordon Research Conferences, June 8-13, 2003, New London, USA.
 4. Nagao, T., Koshio, O., Mabuchi, A., Ohno, N., Takahashi, K., Minamitani, H., Suzuki, K. "Imaging of renal microvascular injury induced by immune abnormality" Gordon Research Conferences, June 8-13, 2003, New London, USA.
 5. Koshio, O, Nagao, T., Ishida-Okawara, A., Mabuchi, A., Suzuki, K. "The contribution of PMN and the degranulated substances to the activation of p38 MAPK and Caspase 8 in the introduction of Apoptosis of human Endothelial cell" Gordon Research Conferences, June 8-13, 2003, New London, USA.
 6. Kazuo Suzuki Seminar in Marine Biological Laboratories. "Role of activated neutrophils in vasculitis development: in-vivo imaging" USA, June 13, 2003, Woods Hole.
 7. 猪原登志子、小野孝彦、野垣文昭、北徹、鈴木和男、武曾恵理「ANCA 関連腎炎・血管炎に対するヒト免疫グロブリン (IVIg) 治療効果の検討」第 46 回日本腎臓病学会学術総会、2003 年 5 月 23 日、東京
 8. Kazuo Suzuki International Symposium Sponsored by Center of Excellence for Advanced Life Science on the Base of Bioscience and Nanotechnology, Sapporo(北海道大学 21 世紀 COE プログラム バイオとナノを融合する新生命科学拠点-ナノ・イメージングによって切り開く新たなバイオ医療 "In-vivo Imaging of Vasculitis", 2003 年 7 月 19 日、札幌
 9. Manger, B., Suzuki, K. 5th International Symposium on IVIG-Intravenous Immunoglobulins in the Third Millenium, "Chair Talk: The Use of IVIG in Collagen Vascular Diseases, Vasculitis and Atherosclerosis", September 25-27, 2003, Interlaken, Switzerland
 10. Ito-Ihara, T., Suzuki, K., Ono, T., Nogaki, F., Suyama, K., Kita, T., Muso, E. 5th International Symposium on IVIG-Intravenous Immunoglobulins in the Third Millenium. "Beneficial effect of intravenous immunoglobulin for patients with myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody (MPO-ANCA)-associated rapidly progressive glomerulonephritis", September 25-27, 2003, Interlaken, Switzerland
 11. 鈴木和男「血管炎の研究がめざす新たな展開：特に ANCA 関連血管炎」第 5 回オステオポンチン研究会、生体防御機能異常ワークショップ 2003、第 6 回肝臓生物学研究会合同年会、2003 年 7 月 17 日～18 日、札幌
 12. 高橋啓、大原関利章、鈴木和男、直江史郎「マウス系統的血管炎誘発モデルにおける動脈病変の免疫組織学的検討」第 5 回オステオポンチン研究会、生体防御機能異常ワークショップ 2003、第 6 回肝臓生物学研究会合同年会、2003 年 7 月 17 日～18 日、札幌
 13. 武曾恵理、猪原登志子、小野孝彦、野垣文昭、北徹、鈴木和男「ANCA 関連腎炎・血管炎に対するヒト免疫グロブリン (IVIg) 治療効果の検討」第 5 回オステオポンチン研究会、生体防御機能異常ワークショップ 2003、第 6 回肝臓生物学研究会合同年会、2003 年 7 月 17 日～18 日、札幌
 14. 原田敏江、三浦典子、安達禎之、鈴木和男、大野尚仁「真菌多糖の in vitro における IFN- γ 産生増強作用の検討」第 5 回オステオポンチン研究会、生体防御機

- 能異常ワークショップ 2003、第 6 回肝臓生物学研究会合同年会、2003 年 7 月 17 日～18 日、札幌
15. 長谷川明洋、長尾朋和、村田薫、稲見真倫、鈴木和男、中山俊憲「関節炎および血管炎の発症における CD69 分子の役割」第 5 回オステオポンチン研究会、生体防御機能異常ワークショップ 2003、第 6 回肝臓生物学研究会合同年会、2003 年 7 月 17 日～18 日、札幌
 16. 越尾修、長尾朋和、石田-大川原明子、馬淵綾子、鈴木和男「血管炎への好中球の関与と炎症性サイトカインによるヒト血管内皮細胞のアポトーシス誘導シグナルの検討」第 5 回オステオポンチン研究会、生体防御機能異常ワークショップ 2003、第 6 回肝臓生物学研究会合同年会、2003 年 7 月 17 日～18 日、札幌
 17. 鈴木和男「レビュートーク：血管炎に関与するインターフェロン γ 」第 68 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、2003 年 7 月 23 日～24 日、東京
 18. 三浦典子、新郷裕子、大原関利章、高橋啓、直江史郎、大川原明子、鈴木和男、大野尚仁「Candida albicans 由来可溶性菌体外多糖 CAWS の血管炎誘発活性」第 68 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、2003 年 7 月 23 日～24 日、東京
 19. 原田敏江、三浦典子、安達禎之、栗原和記、Keiko Ozato、鈴木和男、大野尚仁第「真菌多糖の樹状細胞分化の調節におよぼす影響—IRF-8 欠損マウスの解析から—」第 68 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、2003 年 7 月 23 日～24 日、東京
 20. 越尾修、長尾朋和、石田-大川原明子、馬淵綾子、鈴木和男「血管炎に関与する TNF α および IL-1 β によるヒト血管内皮細胞のアポトーシス誘導シグナルの検討」第 68 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、2003 年 7 月 23 日～24 日、東京
 21. 鈴木和男、大川原明子、長尾朋和、村山研、亀岡洋祐、大原関利章、高橋啓、直江史郎、大野尚仁、三浦典子、武曾恵理、猪原登志子、小野孝彦「血管炎発症における活性化好中球の関与」第 14 回日本生体防御学会、2003 年 7 月 31 日～8 月 2 日、京都
 22. 鈴木和男、松岡俊行、栗原和記、佐々木健夫、Keiko Ozato「血管炎に関与する異常好中球：IRF-8 ノックアウトマウスによる解析」第 14 回日本生体防御学会、2003 年 7 月 31 日～8 月 2 日、京都
 23. 鈴木和男、大川原明子、長尾朋和、村山研、亀岡洋祐、大原関利章、高橋啓、直江史郎、大野尚仁、三浦典子、武曾恵理、猪原登志子、小野孝彦「血管炎発症における活性化好中球の関与」第 14 回日本生体防御学会、2003 年 7 月 31 日～8 月 2 日、京都
 24. 鈴木和男、南谷晴之、山本健二、眞島利和「日本バイオイメージング学会と化学工学会の連携による『ナノとバイオの融合学理構築、産業基盤形成』シンポジウム—公開シンポジウム「ナノとバイオの融合 学理構築、産業基盤形成」開催から学ぶ—」、2003 年 9 月 10 日～11 日、松島
 25. 鈴木和男、長尾朋和、長谷川明洋、中山俊憲、大野尚仁、三浦典子、越尾修、馬淵綾子、南谷晴之「新しいイメージング技術へ向けて—IVI 技術 (in-vivo imaging)—」2003 年 9 月 10 日～11 日、松島
 26. 大川原明子、猪原登志子、武曾恵理、小野孝彦、雑賀寛、根本久一、鈴木和男「糸球体腎炎の発症、進行における好中球活性化の役割— SCG/Kj マウスを用いた解析 —」第 15 回腎とフリーラジカル研究会、2003 年 9 月 20 日、東京
 27. Mabuchi, A., Nagao, T., Koshio, O., Suzuki, K., and Wheatley, A.M. “Induction of F4/80^{high+} Mac-1^{high+} nonparenchymal adherent liver cell suppressor function in T cell-mediated murine hepatic injury: involvement of nitric oxide?” American Association of Liver Diseases in 2003, October 24-28, 2003,

- Boston, USA.
28. 鈴木和男、長尾朋和、越尾 修、馬淵綾子、大野尚仁、高橋 啓、南谷晴之、直江史郎「In-vivo イメージングによる腎微小血管傷害の解析」第8回血管炎研究会、2003年10月18日、秋田
 29. 三浦典子、三川浩輝、安達禎之、大川原明子、大原関利章、高橋 啓、直江史郎、鈴木和男、大野尚仁「*Candida albicans* 菌体外多糖画分 CAWS の DBA/2 マウスに対する血管炎誘発活性と反応性の解析」第9回MPO研究会、2003年10月24日—25日、八王子
 30. 長谷川明洋、長尾朋和、村田薫、稲見真倫、鈴木和男、中山俊憲「関節炎の発症における CD69 分子の役割」第9回MPO研究会、2003年10月24日—25日、八王子
 31. 川上真紀子、鈴木和男、F. Vilhardt、K-H Krause、澤田誠「脳内細胞ミクログリアのMPO産生」第9回MPO研究会、2003年10月24日—25日、八王子
 32. 荒谷康昭、倉 文明、渡辺治雄、赤川久義、高野幸枝、鈴木和男、Nobuyo Maeda、小山秀機「ミエロペルオキシダーゼ欠損マウスのクリプトコッカス感染防御能の解析」第9回MPO研究会、2003年10月24日—25日、八王子
 33. 長尾朋和、長谷川明洋、中山俊憲、大野尚仁、三浦典子、越尾 修、馬淵綾子、南谷晴之、鈴木和男「In-vivo イメージングによる腎微小血管傷害の解析」第9回MPO研究会、2003年10月24日—25日、八王子
 34. 大原関利章、横内 幸、若山 恵、山田仁美、三浦典子、鈴木和男、大野尚仁、直江史郎、高橋 啓「カンジダ菌体抽出物誘導動脈炎モデルにおける動脈炎形成過程の経時的検討」第9回MPO研究会、2003年10月24日—25日、八王子
 35. 三浦典子、三川浩輝、安達禎之、大川原明子、大原関利章、高橋 啓、直江史郎、鈴木和男、大野尚仁「*Candida albicans* 菌体外多糖画分 CAWS の DBA/2 マウスに対する血管炎誘発活性と反応性の解析」第9回MPO研究会、2003年10月24日—25日、八王子
 36. 大川原 明子、武曾 恵理、猪原 登志子、高野 薫、野口 洋子、松田 潤一郎、鈴木 和男「遺伝的ネフローゼ腎炎モデルマウス ICGN の好中球活性化の解析」第9回MPO研究会、2003年10月24日—25日、八王子
 37. 亀岡洋祐、Amanda Persad、池田文恵、仁保善之、鈴木和男「新規ミエロペルオキシダーゼ欠損症患者に同定された遺伝子変異」第9回MPO研究会、2003年10月24日—25日、八王子
 38. 鈴木和男「MPO-ANCA 関連血管炎」第9回MPO研究会、2003年10月24日—25日、八王子
 39. 越尾修、長尾朋和、大川原明子、馬淵綾子、鈴木和男「The contribution of PMN and the degranulated substances to the activation of p38 MAPK and Caspase 8 in the introduction of Apoptosis of human Endothelial cell」第76回日本生化学会大会、2003年10月16日～18日、横浜
 40. 星野昭芳、花木賢一、鈴木和男、山本健二「生体内移入細胞標識マーカーとしての量子ドットの応用」第12回日本バイオイメージング学会学術集会、2003年10月29日—31日、横浜
 41. 鈴木和男「細胞・組織障害のメカニズム解析—血管炎を分子とバイオイメージングで解析する—」第12回日本バイオイメージング学会学術集会、2003年10月29日—31日、横浜
 42. 長尾朋和・長谷川明洋・越尾 修・馬淵綾子・南谷晴之・中山俊憲・鈴木和男「活性酸素誘導の血小板血栓形成における CD69 の役割」第12回日本バイオイメージング学会学術集会、2003年10月29日—31日、横浜
 43. 星野昭芳、花木賢一、鈴木和男、山本健二「生体内移入細胞標識マーカーとしての量子ドットの応用」第12回日本バイオイメージング学会学術集会、2003年10月29日—31日、横浜
 44. 三川浩輝、三浦典子、安達禎之、大川原明子、大原関利章、高橋 啓、直江史郎、

- 鈴木和男, 大野尚仁「*Candida albicans* 由来菌体外多糖画分 CAWS による致死性の血管炎誘発メカニズムの解析」第 33 回日本免疫学会総会・学術集会、2003 年 12 月 8 日～10 日、福岡
45. 大川原明子、三浦典子、大野尚仁、鈴木和男「*C. albicans* 由来物質 CAWS によって誘起されるマウス冠状動脈炎発症における活性化好中球の役割について」第 33 回日本免疫学会総会・学術集会、2003 年 12 月 8 日～10 日、福岡
46. 村田薫、稲見真倫、長谷川明洋、久保秀一、宮本健志、木村元子、山下政克、長尾朋和、鈴木和男、谷口克、中山俊憲「CD69 ノックアウトマウスにおける抗 type II コラーゲン抗体誘導性関節炎発症の抑制」第 33 回日本免疫学会総会・学術集会、2003 年 12 月 8 日～10 日、福岡
47. 長尾朋和、長谷川明洋、越尾 修、馬淵綾子、南谷晴之、中山俊憲、鈴木和男「活性酸素誘導性の血小板血栓形成における CD69 の役割」第 33 回日本免疫学会総会・学術集会、2003 年 12 月 8 日～10 日、福岡
48. 村山 研、長尾朋和、越尾 修、長谷川明洋、中山俊憲、新井孝夫、鈴木和男「活性化好中球における CD69 分子の表面局在」第 33 回日本免疫学会総会・学術集会、2003 年 12 月 8 日～10 日、福岡
49. 濱野慶朋、広瀬幸子、鈴木和男「MPO-ANCA 関連半月体形成性腎炎自然発症モデル SCG/Kj マウスの遺伝的解析」第 33 回日本免疫学会総会・学術集会、2003 年 12 月 8 日～10 日、福岡
50. 武曾恵理、大川原明子、鈴木和男「遺伝的ネフローゼ腎炎モデルマウス ICGN の好中球活性化の解析」第 33 回日本免疫学会総会・学術集会、2003 年 12 月 8 日～10 日、福岡
51. 鈴木和男 “Neutrophil functions of patients with MPO-ANCA-related vasculitis” 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会、2003 年 12 月 8 日～10 日、福岡
52. Aratani, Y., Kura, F., Suzuki, K., and Koyama, H. “*In vivo* role of myeloperoxidase for the host defense against fungal and bacterial infections.” 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会、福岡、2003 年 12 月 8 日～10 日、福岡
53. 荒谷康昭、倉 文明、鈴木和男、小山秀機「*Cryptococcus neoformans* 感染に対する生体防御におけるミエロペルオキシダーゼの役割」第 33 回日本免疫学会総会・学術集会、2003 年 12 月 8 日～10 日、福岡
54. 亀岡 洋祐、Persad Amanda、橋本 雄之、鈴木 和男「ミエロペルオキシダーゼの第 8 ヘリックスにおける日本人集団の変異頻度」第 26 回 日本分子生物学会年会 2003 年 12 月 10—13 日、神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況

たんぱく質構造解析シュミレーション

(米国：平成 15 年)

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—

分担研究者:相澤義房 新潟大学 教授

研究要旨

今遺伝子治療には大きな期待がもたれるが、従来のベクターであるウイルスには、安全性や簡便性に若干の問題がある。我々はラット自己免疫性心筋炎を用いて、プラスミドを用いた遺伝子治療の可能性を様々な遺伝子を導入し検討した。また動脈硬化巣である内膜新生部でのコクサッキーアデノウイルスレセプター(CAR)の発現を検討し、遺伝子治療などのターゲットになりうるかをみた。ラット自己免疫性心筋炎はブタ心筋ミオシンを完全フロイントアジュバントと混和後、ラットに皮下注射して作成した。様々な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)を組み込んだプラスミドを作成し、in vivo でエレクトロポレーションまたは急速大量静注法(hydrodynamics 法)をもちいて遺伝子導入を行い、有用であることを確認した。今後静脈投与法の工夫が要求される。またバルーンによる血管障害モデルで形成される新生内膜(動脈硬化巣)には CAR が一過性に強発現しており、CAR はアデノウイルスをベクターとする遺伝子導入の標的になりえることが示唆された。

A. 研究目的

遺伝子治療は、今後、新しい治療法として大きな期待がもたれている。遺伝子治療のベクターは、従来、導入効率が優れていることから、アデノウイルスやレトロウイルスなど、主にウイルスが用いられてきた。しかし、最近、安全性、簡便性などの理由により、naked プラスミド DNA を用いた遺伝子治療が試みられるようになってきた。プラスミドベクターには、抗原性がなく、染色体への挿入もなく、これによる挿入変異を起こさないことから、安全であるばかりではなく、ベクターの大量調製も低コストで簡便

に行えるため、かなりの医療費の削減にも寄与するものと思われる。その中でも、今回我々の検討した pCAGGS は、強力な発現力を示す CAG プロモーターを持つ cDNA 発現プラスミドであり、発現効率が特に優れている。また、筋肉注射後、電気パルスを与えると注射単独の導入に比べて 100 倍近く導入効率が向上する in vivo electroporation 法が開発され、また最近では、高容量の DNA 溶液を急速にマウスの尾静脈から注射し、肝臓にウイルスベクターと同等に高発現する hydrodynamics-based transfection 法が開発され、欠点であった導入

効率も大幅に改善しつつある。

一方、循環器疾患は、難治性で致命的な疾患が現在でも数多く存在する。また動脈硬化により引き起こされる循環器疾患は、国民の多くが罹患する疾患の一つであり、今後の医療の最も大きな課題の一つであり、その進展には動脈硬化巣内での慢性炎症が関わり、病像を修飾している。このような循環器疾患に対するプラスミドによる遺伝子治療が確立されれば、多くの人々に恩恵がもたらされる可能性がある。これまで我々の教室では、ヒトの劇症型心筋炎あるいは拡張型心筋症に類似したモデルであるラット自己免疫性心筋炎 (EAM) の検討を重ねてきた。劇症型心筋炎は健康人が突然発症し、たとえ早急に適切な治療が施されても、致死に至ることがある重症な難治性疾患である。また拡張型心筋症は、薬剤が奏効しないときには、心臓移植しか治療法のない難治性疾患である。EAM は、急性期にはヒトの劇症型心筋炎に、また慢性期には拡張型心筋症に類似する我々が独自に独自に確立したモデルである。

今回我々は、この EAM に対し、プラスミドを用いた遺伝子治療の可能性を様々な遺伝子とその導入法を検討した。また、罹患率の高い動脈硬化疾患に対して、コクサッキーアデノウイルスレセプター (CAR) が遺伝子治療などのターゲットになりうるか、局所での発現を検索した。

B. 研究方法

ブタ心筋ミオシンを完全フロイントアジュバントと混和後、ラットに皮下注射し、EAM 心筋炎

モデルを作成した。これに対し、様々な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) を組み込んだプラスミドを作成し、*in vivo* でエレクトロポレーションを併用した筋肉注射法あるいは急速大量静注法 (hydrodynamics 法) をもちいて遺伝子治療を行い、その効果を病理組織学的あるいは血行力学的に評価した。プラスミドベクターは pCAGGS を用い、各々の遺伝子の cDNA は RT-PCR にて増幅し、作成した。血中濃度は、その蛋白の ELISA 法により測定したが、測定法が確立されていない場合には、グルカゴン 19-29 を C 端側に付加し、それを RIA 法で測定することによって求めた。また、その治療のターゲットとなる細胞を同定するために、心筋炎の心臓からそれぞれの細胞 (心筋細胞、T 細胞、単球/マクロファージ、非心筋非炎症性細胞) を分離精製し、そのターゲットとなる受容体の mRNA をリアルタイム RT-PCR によって測定し、標的細胞を同定した。さらに、治療群の血清を、*in vitro* で培養した標的細胞に加え、どのような影響を及ぼすのかを、リアルタイム RT-PCR によって検討し、その治療効果の機序を検討した。

また、バルーンで内膜剥離を起こして動脈硬化を誘導し、その際硬化巣を形成する新生内膜の増殖細胞に CAR が発現するかを検討し、CAR が遺伝子治療におけるターゲットとなりうるかどうかを検討した。

C. 研究結果

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 は発症を抑えることができた。(図 1、2)

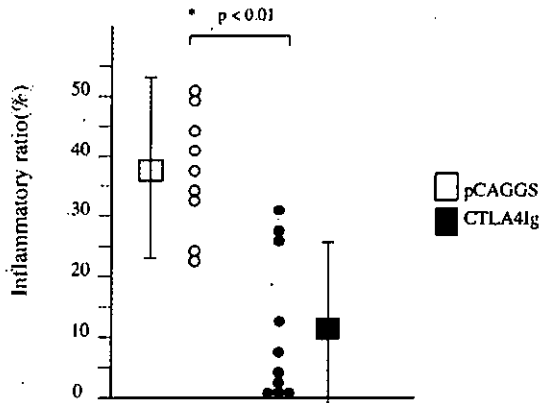


図 1 pCAGGS-CTLA4-Ig をもちいた遺伝子導入による EAM 抑制効果。CTLA4-Ig 治療により、心臓の心筋炎病変面積率は、コントロールの pCAGGS を投与した群に比べて、有意に減少していた。

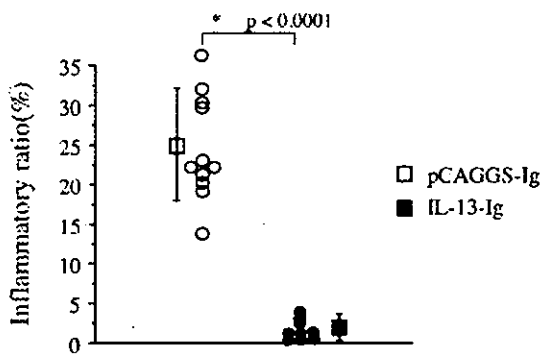


図 2 pCAGGS-IL-13-Ig をもちいた遺伝子導入による EAM 抑制効果。IL-13-Ig 治療により、心臓の心筋炎病変面積率は、コントロールの pCAGGS-Ig を投与した群に比べて、有意に減少していた。

投与方法としては、in vivo で電極ポレー

ションを併用した筋肉注射よりも、hydrodynamics 法のほうが、蛋白の血中濃度を高く保つことができた。(図 3)

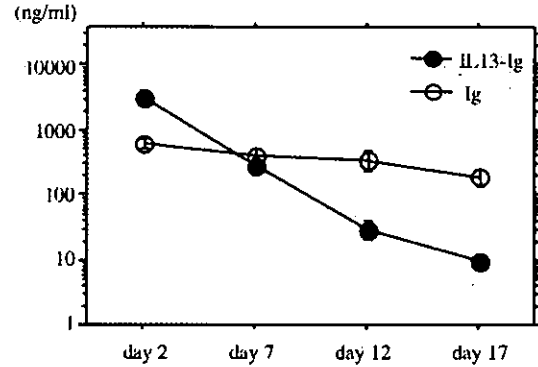


図 3 pCAGGS-IL-13-Ig、pCAGGS-Ig を投与したときの発現蛋白の血中濃度。グルカゴン 19-29 を標識にして、蛋白質の血中濃度を測定したところ、初期には約 $3 \mu\text{g/ml}$ の高い血中濃度が得られた。

またグルカゴン 19-29 の標識を用いて測定した血中濃度のデータでは、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ることが明らかになった。その中でも 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り、(図 1、2) 今後、特に治療として使える可能性があると考えられた。心臓から分離精製した細胞を用いた IL-13-IgG 治療の標的細胞の検索では、単球/マクロファージ、非心筋非炎症性細胞が IL-13 受容体を発現しており、それらが標的細胞と考えられた。同様に、IL-1 受容体アンタゴニスト-IgG 治療の標的細胞の検索では、IL-1 受容体、IL-1 受容体修飾因子を共に発現している細胞は T 細胞、非心筋非炎症性細胞であり、それらが標的細胞と考えられた。そこで、T 細胞、および心臓から

非心筋非炎症性細胞を分離培養し、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。その結果、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、一方、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、このような機序により、EAM の発症を抑えた可能性が示唆された。

また、バルーンによって誘導された動脈硬化には、新生内膜が増殖していたがそこで増殖する細胞には CAR の強い発現を認めた。しかし、CAR の発現は1-2習慣で増殖とともに終息し、一過性であった。しかしアデノウイルスをベクターとすれば新生内膜に比較的特異的に導入されると考えられ、遺伝子治療において動脈硬化病変の発生を抑制する可能性が示唆された。

D. 考察

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かとと思われる。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かとと思われる。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。

今回、我々は、以前より検討を重ねてきたラットの自己免疫性心筋炎 (EAM) に対して遺伝子治療を試みた。このモデルは、劇症型の巨細胞性心筋炎、慢性期には拡張型心筋症に類似するモデルと考えられている。T 細胞が発症に重要であることが判明しており、この時、Th1 サイトカインが重要であると考えられている。今回、有効性が認められた IL-10、IL-13 は Th2 サイトカインであるが、これらを用いることにより、発症を抑制できると考えられた。また、IL-1 受容体アンタゴニストは、現在、関節リウマチの臨床で既に効果が期待されているが、このような自己免疫性心筋炎など、もっと適応範囲が広がる可能性が示唆された。IL-1 受容体アンタゴニストの作用により、T 細胞の Th1 サイトカインの産生が抑制されたり、また線維芽細胞などの非心筋細胞の PGE2 の産生が抑制

され、EAM が抑制された機序が推測された。CTLA-4 は最近、移植の分野でも効果が期待されている薬剤である。今回の検討でも、著明な効果を示したことから、今後幅広い疾患に対して、治療薬になる可能性があると推測される。またプロテアーゼインヒビターである SLPI は抗ウイルス作用も持つことから、ウイルスによるものか自己免疫によるものか原因のはっきりしない急性心筋炎には使いやすい薬剤であるかもしれない。今後、様々な角度から検討し、副作用がより少なく、よりよい効果の期待できる薬剤の開発のため検索を続けている。

Naked プラスミド DNA を用いた遺伝子治療の今後の課題の一つとして、より効率的な標的臓器への発現を可能にすることが重要である。今回検討したプラスミドの hydrodynamics 法による遺伝子導入は、急速に静注するその圧力によって遺伝子導入ができる方法と考えられるが、全身の血管に圧力をかけることが必要で、ヒトに応用するにはまだ無理がある。そのためのカテーテルや投与方法の工夫のための研究を続行している。

虚血性の循環器疾患に対する遺伝子治療の開発も重要なテーマである。現在、HGF の naked プラスミド DNA を用いた慢性下肢虚血疾患に対する臨床試験が進められているが、動脈硬化を治療することは、その高い罹患率から考えて、今後の医療の重要な課題である。どれをターゲットにするか、またドラッグデリバリーを考えると、何を利用するかは、よりよい効果を期待する上で重要である。これまで我々は、胎生期に脳と心臓の特異的に大量に発現するコクサッキーアデノウイルス受容体

(CAR)の役割を検討してきたが、CAR がラットの内皮に発現しており、さらにバルーン損傷で出現する硬化巣(新生内膜)にも一過性に出現することを確認した。これは CAR を標的としたアデノウイルスをベクターとして動脈硬化の発症抑制の可能性を示唆しており、動脈硬化の抑制に有効な蛋白製剤や遺伝子のデリバリーを可能にできるかもしれないと思われた。

E. 結論

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が示された。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。

F. 研究発表

1) 国内

口頭発表 4 件

Gene therapy on EAM with pCAGGS plasmid encoding SLPI/IgG1Fc chimera

第 66 回日本循環器学会総会平成 14 年 4 月
Effect of gene transfer of cytotoxic T lymphocyte associated molecule 4-IgG1Fc chimera (CTLA4Ig) by electroporation against experimental autoimmune myocarditis.

第 66 回日本循環器学会総会平成 14 年 4 月

など

2) 国外

原著論文による発表 7件

文献

1. Watanabe K, Nakazawa M, Fuse K, Hanawa H, Kodama M, Aizawa Y, Ohnuki T, Gejyo F, Maruyama H, Miyazaki J. Protection against autoimmune myocarditis by gene transfer of interleukin-10 by electroporation. *Circulation*. 2001;104:1098-1100.
2. Higuchi N, Maruyama H, Kuroda T, Kameda S, Iino N, Kawachi H, Nishikawa Y, Hanawa H, Tahara H, Miyazaki J, Gejyo F. Hydrodynamics-based delivery of the viral interleukin-10 gene suppresses experimental crescentic glomerulonephritis in Wistar-Kyoto rats. *Gene Ther*. 2003;10:1297-1310.
3. Maruyama H, Higuchi N, Nishikawa Y, Kameda S, Iino N, Kazama JJ, Takahashi N, Sugawa M, Hanawa H, Tada N, Miyazaki J, Gejyo F. High-level expression of naked DNA delivered to rat liver via tail vein injection. *J Gene Med*. 2002;4:333-341.
4. Hanawa H, Watanabe R, Hayashi M, Yoshida T, Abe S, Komura S, Liu H, Elnaggar R, Chang H, Okura Y, Kato K, Kodama M, Maruyama H, Miyazaki J, Aizawa Y. A novel method to assay proteins in blood plasma after intravenous injection of plasmid DNA. *Tohoku J Exp Med*. in press.
5. Ito M, Kodama M, Masuko M, Yamaura M, Fuse K, Uesugi Y, Hirono S, Okura Y, Kato K, Hotta Y, Honda T, Kuwano R, Aizawa Y.

Expression of Coxsackievirus and Adenovirus Receptor in Hearts of Rats With Experimental Autoimmune Myocarditis. *Circ Res*. 86:275-280,2000

6. Nasuno A, Toba K, Ozawa T, Hanawa H, Osman Y, Hotta Y, Yoshida K, Saigawa T, Kato K, Kuwano R, Watanabe K, Aizawa Y. Expression of coxsackievirus and adenovirus receptor in neointima of the rat carotid artery. *Cardiovasc Pathol*. in press.
7. Kashimura T, Kodama M, Hotta Y, Hosoya J, Yoshida K, Ozawa T, Watanabe R, Okura Y, Kato K, Hanawa H, Kuwano R, Aizawa Y. Spatiotemporal changes of coxsackievirus and adenovirus receptor in rat hearts during postnatal development and in cultured cardiomyocytes of neonatal rat. *Virchows Arch*. 2003 Nov 18 [in press]

G. 知的所有権の出願・取得状況

1) 特許取得

特許名: 遺伝子治療用ベクター及びそれを用いた血中濃度測定法

出願年月日: 平成 15 年 1 月 10 日

出願番号: 特願 2003-003967

出願国: 日本

特許名: 遺伝子治療用ベクター及び該遺伝子治療用ベクターを投与された哺乳動物中又は培養細胞中の目的タンパク質定量方法

出願年月日: 平成 15 年 12 月 26 日

出願番号: 03PF275-PCT

出願国: 米国、欧州など

家族性地中海熱と遺伝子異常に関する研究

分担研究者 布井博幸 宮崎大学医学部小児科教授
研究協力者 佐藤さくら 宮崎大学医学部小児科医員
日高文郎 宮崎大学医学部小児科・大学院

要旨

初期免疫異常と高サイトカイン血症に伴う多臓器不全とは何らかの遺伝子異常があるのではないかと考えられている。今回、我々は繰り返す不明熱を主訴に入院された患者を、遺伝子解析により日本に珍しい家族性地中海熱と診断した。この疾患は pyrin という初期免疫に関わる蛋白変異によることは知られているが、まだその病態が十分解明されていないので、臓器不全との関係で検討した。

A. 研究目的

最近、初期免疫 (innate immunity) に関わる分子として、非特異的リセプター (Toll like receptors1-6, TLR1-6 など)¹⁾ から、そのシグナル伝達機構 (Nod subfamily; Nod2, Nalp subfamily; Nalp3, Ipaf subfamily; Naip, Naip5, CIITA subfamily; CIITA, NBS-LRR-associated proteins; Pyrin) が解析され、それらの分子異常も報告されるようになってきた²⁻⁴⁾ (表1)。

一方、多臓器不全を伴うインフルエンザ脳症の病態は、種々のサイトカインが上昇していることや単核球で NF- κ B が高発現していることが明らかとなり、高サイトカイン血症が起こっていることが明らかになった⁵⁾。さらに、我々のデータ⁶⁾ から重症インフルエンザ脳症例では、病初期から血中 cytochrome c の上昇が認められ、全身のアポトーシスを伴う臓器不全が起こっているのではないかと推論されるようになった。この様な病

態が病初期の極く短い間に起こることより、初期免疫の異常が想定された。さらに、この病態の病因を考えると、1) 同じインフルエンザに罹っても脳症を起こす人と起こさない人がいること、2) この疾患が東アジアを主体におこっており、欧米からほとんど報告されないことより、何らかの人種による遺伝的バックグラウンドがあるのではないかと考えられている。ただし、15年暮れからの米国でのインフルエンザの流行では5歳以下の子供たちの死亡例が多数報告されている。

今回、高サイトカイン血症が予想される auto-inflammatory disorder 疾患の一つである家族性地中海熱患者を経験した。この疾患は pyrin という食細胞に特異的に発現している蛋白の変異によって起こる疾患であるが、不明熱の原因については現在も解明されていない。pyrin ドメインを有する Nod family 蛋白は20以上も知られており、いずれもサイトカイン産生やアポト

ーシスに関与することで注目されている²⁻⁴⁾。これらの初期免疫に関わるいずれかの遺伝子異常とインフルエンザ脳症などに伴う原因不明の多臓器不全とに何らかの関与があるのではないかと考えている。

B. 研究方法

【症例】 14歳女児

【主訴】 間欠的発熱

【現病歴】

平成13年7月11日 発熱、その後頭痛、悪心もあり、7月17日 7月30日 県立病院入院
精査するも異常なく、抗生物質投与にて7月25日に解熱退院となる。8月7日退院後も微熱が続くため、抗生物質内服、
9月6日再び高熱(38度台)続き、9月7日
9月20日同院入院となる。この時も抗生物質に反応せず、自然に解熱している。10月24日も再び高熱出現し10月29日 10月31日経過観察入院。退院後も37 38度台の発熱あり。
11月22日当科紹介入院となった。

【既往歴】 蕁麻疹

【家族歴】 collagen disease ()、同様の症状のもの ()、TB ()

【入院時身体所見】

体重:55.3kg(5ヶ月間で体重減少なし)、身長:156.7cm

口腔内、リンパ節、胸腹部、皮膚、関節異常なし

【検査所見】

《CBC》WBC:6300/mm³ (Neut:78.1%,
Eo:0.1%,Ba:0.2%,Mo:6.1%, Ly :15.5%),RBC:5.07
×10⁴/mm³,Hb:12.0 g/dl,Ht:37.0%,Plt:28.5×
10⁴/mm³,Retic:2.54 %

《Serum chemisry》肝機能正常、電解質異常なし、腎機能障害なし、

TP:7.88g/dl,Alb:4.06g/dl,CRP:7.2 mg/dl、
IgG:1467mg/dl, IgA:357mg/dl, IgM:91mg/dl,
IgD:0.6mg/dl, IgE:1865.6, CH50:59U/ml,
C3:167mg/dl, C4:40mg/dl, フェリチ
ン:21.3ng/ml, sIL-2 レセプター:1330U/ml,
2-5AS 活性:311pmol/dl, 尿中β2MG:158ng/ml

《ウイルス抗体価》

EBV,CMV 既感染パターン,アデノウイルス:16倍,
《各種自己抗体》

RF:1IU/ml,抗RNP抗体:(-),抗Sm抗体:(-),MPO-ANCA:<10,P-ANCA:<10,抗SS-A抗体:(-),抗SS-B抗体:(-)

《その他の検査》

骨髄・髄液異常なし

ツベルクリン反応:22×18mm

寄生虫抗体(宮崎医科大学寄生虫学教室):陰性
ツツガムシ抗体:陰性

培養(咽頭、血液、尿、便):繰り返し検査するも有意菌なし

便潜血:陰性

【画像所見】

X-p, 骨シンチ, Gaシンチ, 腹部エコー, 心エコー,
頭部・腹部・胸部CTにても異常なし、眼科・耳鼻科異常なし

【soluble TNF Receptor1 測定】

soluble TNF Receptor1 (sTNF R1) の測定は Quantikine human sTNF R1 immunoassay ELISA kit(R&D systems, INC)を用いて測定した。血中のsTNF R1の正常値は749-1966 pg/mlで、今回の正常値は1000pg/ml以下と考えた。

【遺伝子解析】

pyrin 遺伝子をコードする MEFV 遺伝子の解析を行った⁷⁾ところ、exon3 の 369 番目の cytosine が Thymine へ変異し、369 番目の proline が Serine に置換されていた。

(倫理面への配慮) 遺伝子検索に当たっては、両親および本人へ十分な説明を行った上で、インフォームドコンセントを得て行った。

C. 研究結果

【入院後経過】

入院後は、前医にて抗生剤投与で軽快せず、各種培養にて起炎菌検出されていなかったため抗生剤投与なしにて経過を観察した。熱型は弛張熱を示していたが CRP は徐々に低下した。12月4日には再び CRP:6.7 まで上昇、12月7日には解熱し、12月18日まで11日間発熱は認めなかった。解熱期にも CRP は陰転化し、12月18日から1月3日まで再び弛張熱を認めた。CRP は最高 9.6 まで上昇し、抗生剤投与なしに軽快した(図1)。それ以降の平成14年、15年の発熱の経過を図2に示した。15年は約1年間に渡り熱発は認められなかったものの、年末にかけて再び不明熱が出現し、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ている(図3)。

【検査結果】

1) 一般検査では、補体の上昇、Transferrin, sIL-2, 持続的な CRP 上昇が認められたが、特異的な所見は認められなかった。

2) 血中 sTNF R1 は 3000-1500pg/ml と経過を通

じて高値であり、TRAPS は否定された。

3) 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⁸⁾、この変異が病因であることが確定された(図4)。

D. 考察

経過中、白血球上昇はなく、また頭痛、下肢の筋肉痛を時々伴う以外は他の症状はなく、皮膚の発疹、口腔内アフタも認められなかった。上記の身体所見と検査結果から一般的な悪性腫瘍、感染症、膠原病、詐病熱、眼科、耳鼻科的疾患を含めた病因による不明熱は否定された。そこで、周期的に発熱を繰り返す特殊な遺伝性疾患として、hereditary auto-inflammatory disorders という概念の疾患の鑑別を行った(表2)。身体的特徴などから、tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome (TRAPS), familial Mediterranean fever(家族性地中海熱:FMF)を疑い、鑑別を行った。患者血中可溶性 TNF α レセプターは正常 上昇しており、TRAPS は否定された。残る FMF については FMEFV 遺伝子解析を行い、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% (11/32)、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ろうと議論されている。

家族性地中海熱は pyrin 変異によって起こることが知られている。pyrin domain (PRD) を持つ蛋

白は多く知られており、初期免疫やアポトーシスの調節に関わっている。発熱の原因についてはまだ解析されていない。我々はこれまで報告されているC5a不活化酵素の低下とpyrinの関係を明らかにすべく検討を加えている。岡田らは、炎症局所でC5aを不活化するcarboxy peptidase R (CPR)とその前駆分子pro CPRを見出している。この前駆分子は好中球から放出されるelastaseにより活性化される。このelastaseはelastase inhibitorにより抑制されるが⁹⁾、pyrin分子と何らかの関係があるのではないかと考えている(図5)。

インフルエンザ脳症の様に同じ病原体に罹患しながら、脳症までをおこし、死亡にいたる症例がある。現在のところ、この様な症例ではインフルエンザ感染により、NF- κ Bの活性化が著しく起こっていること、また、重症例ではアポトーシスが誘導されていることが分かっており、各々の段階での何らかの遺伝子異常が関与しているのではないかと考えている。

E. 結論

同上

F. 健康危険情報

結果に示したように、コルヒチン投与により、発熱の予防効果を得ている。現在の所コルヒチンによる副作用は認められない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Moritake H, Sugimoto T, Kuroda H, Hidaka F, Takahashi Y, Tsuneyoshi M, Hidaka F,

Takahashi Y, Tsuneyoshi M, Yoshida MA, Cui Q, Akiyoshi K, Izumi T, Nunoi H. Newly established Askin tumor cell line and overexpression of focal adhesion kinase in Ewing sarcoma family of tumors cell lines. *Cancer Genet Cytogenet.* 146, 102-9, 2003.

Nunoi H, Kohi F, Kajiwara H, Suzuki K. Prevalence of inherited myeloperoxidase deficiency in Japan. *Microbiol Immunol.* 47, 527-31, 2003.

Sugimoto Y, Tsukahara S, Sato S, Suzuki M, Nunoi H, Malech HL, Gottesman MM, Tsuruo T. Drug-selected co-expression of P-glycoprotein and gp91 in vivo from an MDR1-bicistronic retrovirus vector. *J Gene Med.* 5, 366-76, 2003.

Takeya R, Ueno N, Kami K, Taura M, Kohjima M, Izaki T, Nunoi H, Sumimoto H. Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *J Biol Chem.* 278, 25234-46, 2003.

Sonoda T, Kouno K, Sawada K, Takagi J, Nunoi H, Harada N, Matsumoto N. Duplication (22)(q11.22-q11.23) without coloboma and cleft lip or palate. *Pediatr Int.* 45, 97-9, 2003.

布井博幸 慢性肉芽腫症研究の進歩と治療の問題点 小児感染免疫 15、31-319、2003

水上智之、布井博幸、原発性免疫不全症の遺伝カウンセリングと予後 周産期医学 33、1145-1149、2003

2. 学会発表

なし

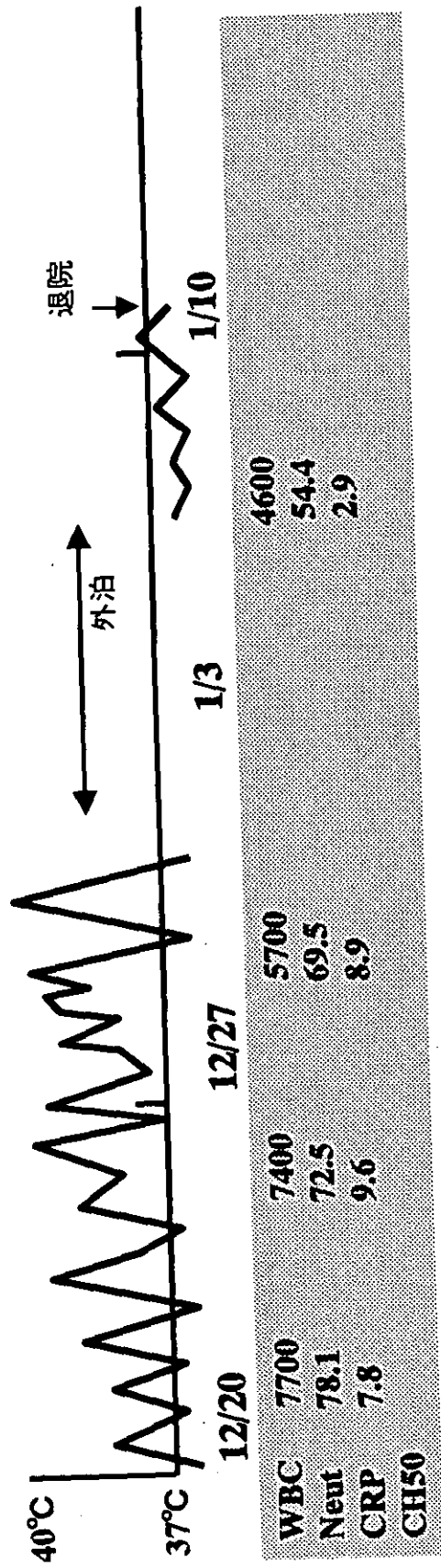
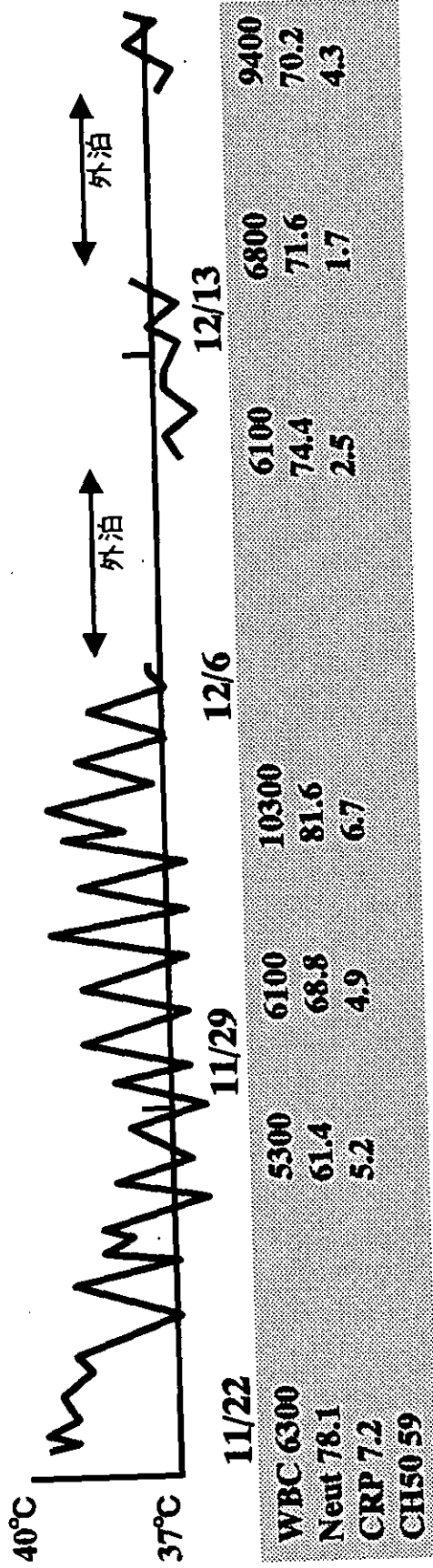
H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Human and animal diseases associated with mutations in NBS-LRR proteins.

NBS-LRR protein	Other names	Associated diseases a	Predicted defect a
Nod subfamily			
Nod2	Card15	Crohn's disease Blau syndrome	Defective bacterial ligand sensing/other? Constitutive (i.e. ligand-independent) activation of NF-B
Nalp subfamily			
Nalp3	Pypaf1, CIAS1 Cryopyrin,	Muckle-Wells syndrome (MWS) Chronic infantile, neurologic, cutaneous, articular syndrome (CINCA) Familial cold auto-inflammatory syndrome (FCAS)	Ligand-independent activation of caspase 1; increased IL-1 secretion as above Cold-triggered activation
Ipaf subfamily			
Naip	Birc1	Spinal muscular atrophy (Roy <i>et al.</i> , 1995)	Failed caspase inhibition (Liston <i>et al.</i> , 1996).
Naip5 (murine)	Birc1e	Susceptibility to <i>Legionella pneumophila</i> infection	as above or lack of bacterial sensing?
CIITA subfamily			
CIITA		Bare lymphocyte syndrome (Steimle <i>et al.</i> , 1993)	Lack of MHCII expression due to no nuclear translocation
NBS-LRR-associated proteins			
Pyrin	Marenostrin	Familial Mediterranean fever	Defective bacterial ligand sensing and apoptosis (Chae <i>et al.</i> , 2003)

入院後経過



その後の発熱経過

