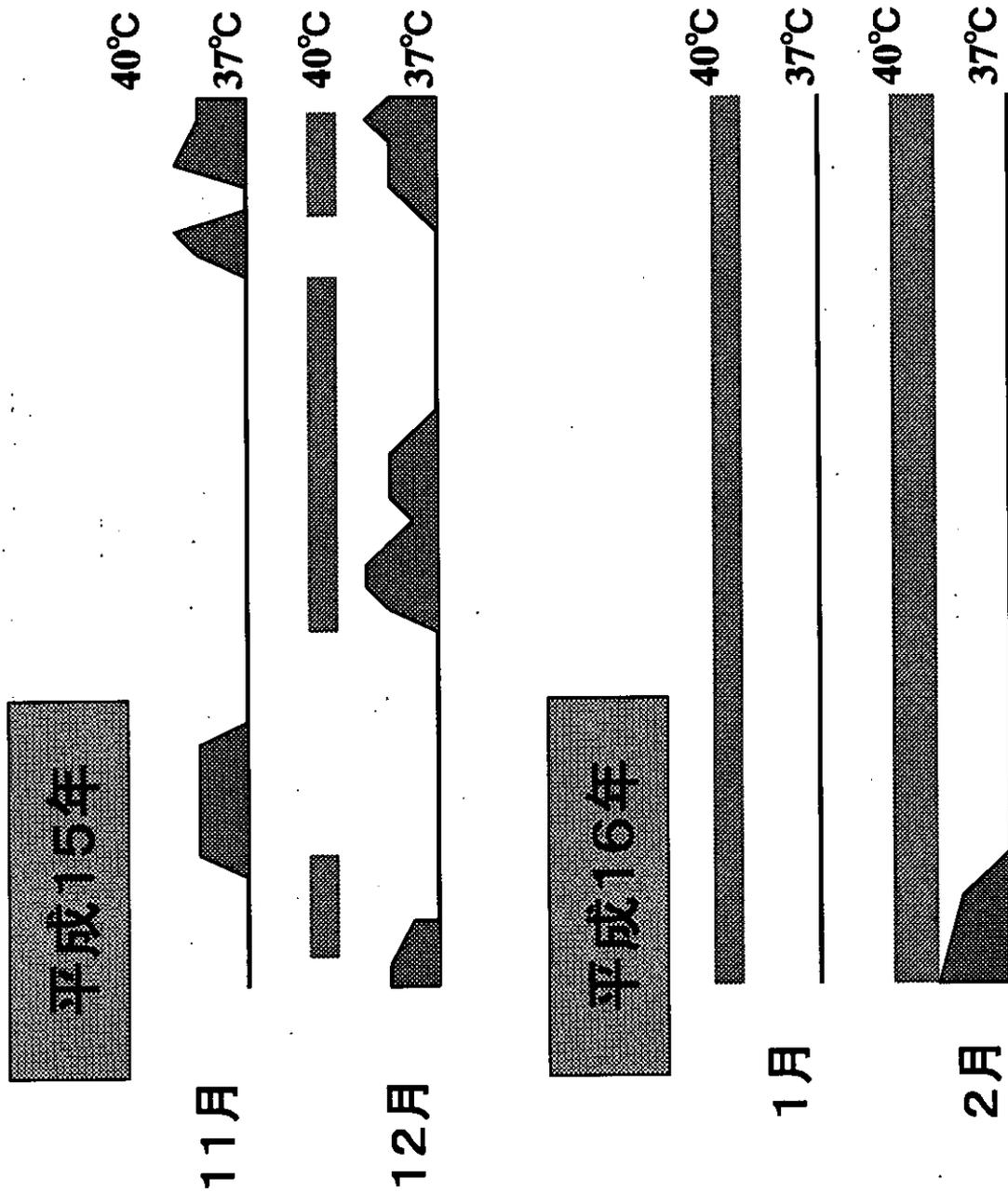


コルヒチン投与後の経過

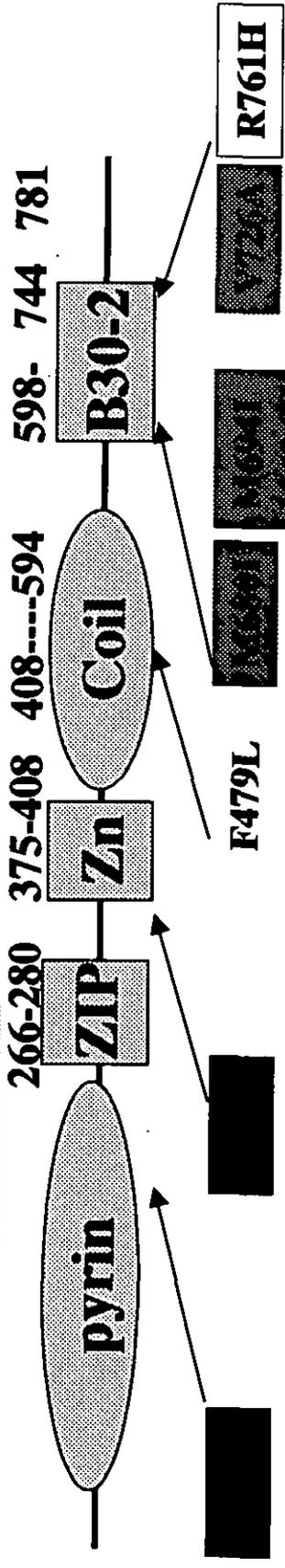


鑑別疾患

周期的に発熱を繰り返すことから周期性発熱症候群の鑑別を行った。

1. CINCA chronic infantile neurologic cutaneous articular syndrome
2. FCAS familial cold autoinflammatory syndrome
3. FMF familial Mediterranean fever
4. HIDS hyperimmunoglobulinemia D with periodic fever syndrome
5. MWS Muckle–Wells syndrome
6. NOMID neonatal-onset multisystem inflammatory disease
7. PAPA pyogenic sterile arthritis, pyoderma gangrenosum, an acne
8. TRAPS tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome

MEFV遺伝子解析

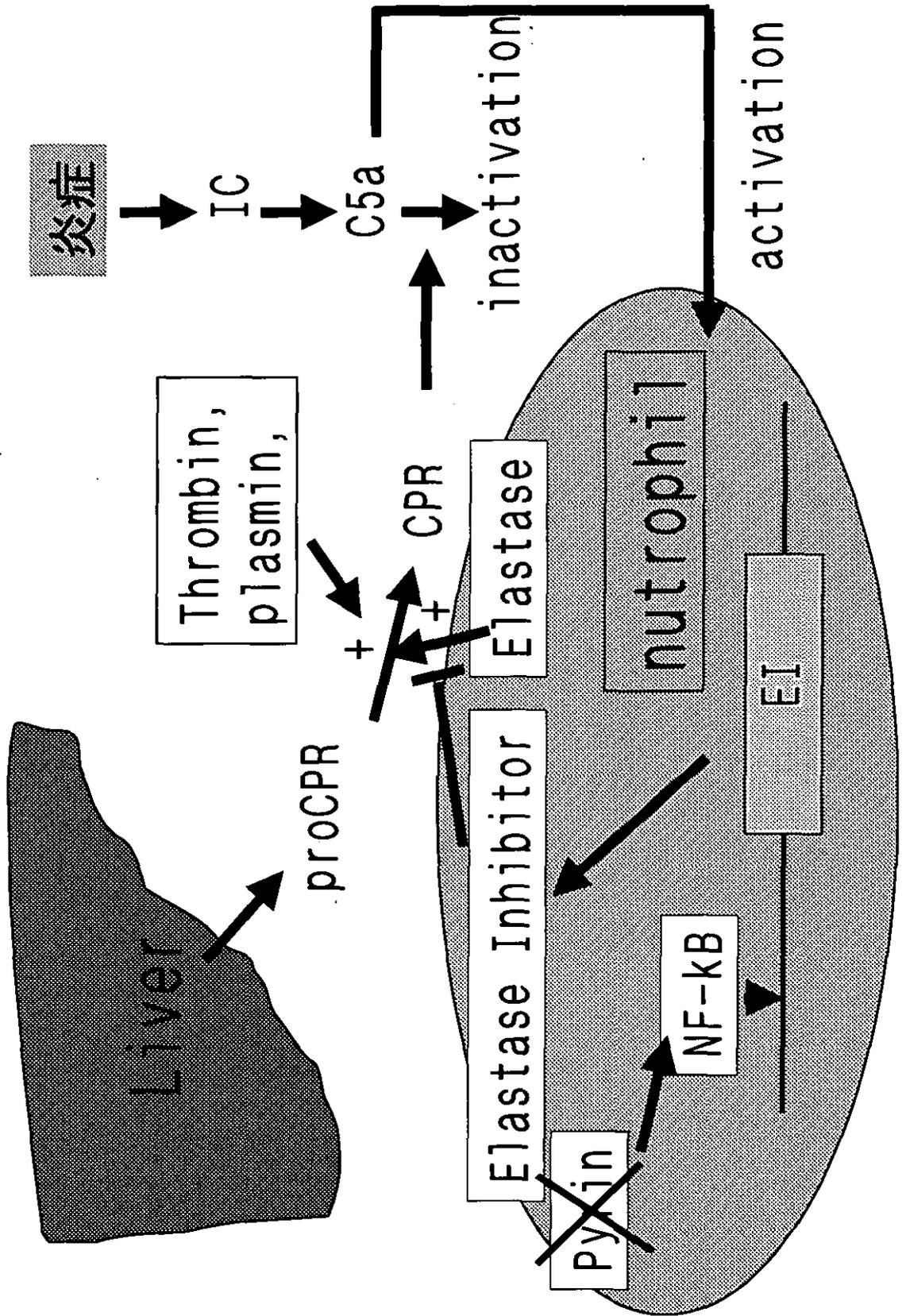


Exon 2	148 Glu → Gln
Wild type	Pro C C C G A G G C C Ala Gln
Patient	C C C G A G G C C G A G G C C Ser

Exon 3	369 Pro → Ser
Wild type	Ser A G C C C C C Gln
Patient	A G C C C C C C A G



予想している病態



炎症における carboxypeptidase R(CPR)の役割に関する研究

分担研究者 岡田秀親 福祉村病院長寿医学研究所長（名古屋市立大学名誉教授）

研究要旨

微生物の侵入時に活性化した補体は、好中球の局所集積や活性化を司るアナフィラトキシン C5a を生成する。その C5a は多臓器不全などの病態において、病態形成の主要な因子の一つと考えられる。C5a 等の起炎ペプチドの多くはカルボキシル基末端（C 末）のアミノ酸はアルギニンやリジンなどの塩基性アミノ酸になっている。このような C 末の塩基性アミノ酸を切除する酵素が Basic Carboxypeptidases であり、血漿中には Carboxypeptidase N (CPN) と Carboxypeptidase R(CPR) とが存在し、特に CPR が重要な役割を果たしていると考えられる。C5a を不活かす CPR に関する研究と共に、C5a の活性を阻害する相補性ペプチドの設計を我々が開発したプログラムソフトである MIMETIC をもちいて行い、C5a の作用を特異的に阻害する Pep-A を開発した。Pep-A は、7 nM の低濃度で、C5a によるカルシウムインフラックス惹起活性を阻害する 17 アミノ酸からなるペプチドであるが、ラットのショックモデルにおいても 0.4 mg/kg で救命効果を発揮し、4 mg/kg では、全例のラットを救命することができた。皮内反応での炎症制御作用を見る方法として、ラットにエバンスブルーを静注しておき、皮内に Crry に対する抗体で局所炎症を起こすときに Pep-A を混ぜておいても炎症反応を抑制できなかった。しかし、Pep-A の N 末をアセチル化した AcPep-A には抑制作用が認められた。マウスに CAWS を投与してショック死を起こす系に於いても、AcPep-A がショック死抑制作用をしめした。AcPep-A の方が、Pep-A よりも生体内に投与したときの安定性が高いためであると考えられた。一方、病態における CPR の役割を解析する動物モデルとして、ProCPR 遺伝子をノックアウトしたマウス (ProCPR^{-/-}) を創生することができた。この ProCPR^{-/-} に LPS を投与して翌日に補体を強力に活性化する作用を持つ Cobravenom factor (CVF) を静脈内に投与すると、補体活性化による炎症反応を制御できずに半数のマウスが死亡した。ヘテロに ProCPR 遺伝子を持つマウスや、野生型マウスでは LPS 感作後に CVF を投与しても障害を起こさない。このことから、ProCPR が活性化されて生成される 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。

A. 研究目的

微生物の侵入時に活性化した補体は、好中球の局所集積や活性化を司るアナフィラトキシン C5a を生成する。その C5a は多臓器不全などの病

態において、病態形成の主要な因子の一つと考えられる。そこで、C5a の活性を阻害する薬剤が開発できれば多臓器不全や DIC などの重篤な炎症反応の制御に活用できると考えられる。そこで、

標的分子のアミノ酸配列（ペプチド）に反応する相補性ペプチドを設計する我々が開発したコンピュータプログラムの MIMETIC を用いて、C5a を阻害するペプチドを設計して合成した 17 アミノ酸からなる Pep-A に C5a 阻害活性が認められた。生体内での安定性を高めるためにアミノ基末端（N 末）をアセチル化した AcPep-A も合成して検討を行った。

一方、血漿中には、カルボキシペプチダーゼ N (CPN) が常時活性型で存在するのに対し、カルボキシペプチダーゼ R (CPR) は、トロンピンやプラスミン等のトリプシン様酵素によって前駆体のプロカルボキシペプチダーゼ R (proCPR) から生成される新鮮血清でみつかった不安定な酵素である。トロンピン活性化性線溶阻害因子 (TAFI)、プロカルボキシペプチダーゼ U と呼ばれる。この酵素はキニンやアナフィラトキシン等の炎症ペプチドの C 末端の塩基性アミノ酸を除去して不活性化する。proCPR は実験動物に LPS を投与すると消費と発現の増強が観察され、炎症部位に集積活性化する好中球から放出されるエラスターゼも proCPR を CPR に活性化する作用を持ち、過剰な炎症反応を制御するネガティブフィードバックシステムとして働くと考えられた。しかし、CPR はフィブリンの C 末リジンを除去することにより、血栓などを溶解するプラスミンの生成を阻害して、血栓を溶けにくくする作用も持つので、その様な場合には、CPR の生成を防ぐことも必要となる。そこで、proCPR の生体内での役割を明らかにするために、proCPR の遺伝子をノックアウトしたマウスの作成もおこない解析をおこなった。

B. 研究方法

相補性ペプチドの設計

相補性ペプチド設計のプログラムは以下のこ

とくである。標的ペプチドのアミノ酸配列について、任意に設計した同じ数のアミノ酸からなるペプチドの相補性を評価して相補性値を算出する。評価指標の一つは、疎水性値である。ペプチドの各位置のアミノ酸について、その前後のアミノ酸（前後のアミノ酸を 5 個ずつもしくは数個ずつ、末端アミノ酸の場合には 0 個）を加えて、疎水性値の平均値を算出し、その疎水性値が逆の値になっていることで評価する。+3.0 であれば、-3.0 をそのアミノ酸の位置での疎水性評価を満点とする。第二の評価指標は、対応する位置のアミノ酸側鎖の容積(bulkiness)の対応性である。対応するアミノ酸同士の α 炭素（アミノ酸の側鎖が結合している基部の炭素原子）が 5 オングストローム近くに相互に接近することを阻害しない側鎖容積になっていることを評価し、容積阻害を起ささない場合を満点とし、阻害の程度により減点評価する。第三の評価指標は、ペプチド骨格のバックボーン並列性(Backbone alignment)の一致度を評価指標として、評価点をつける。標的ペプチドに対して同一アミノ酸数からなる任意に設計したペプチドを候補ペプチドとして標的ペプチドに対する相補性を評価してその評価値をコンピュータメモリーに記録する。次いで上記候補ペプチドのアミノ酸配列をスクランブルして別の配列に変えたり、アミノ酸の置換も任意に行い別の候補ペプチドを設計し、標的ペプチドに対する相補性を評価してその評価値をコンピュータメモリーに記録する。これを連続して繰り返し、理想的には満点値のペプチドが得られるまで繰り返して連続して行う。それぞれのペプチドを評価した記録を得点の高いものからソートして並べて一覧表を作り、上位のもの（例えば上位 300 のペプチド）を記録として残し一覧表にする。

相補性ペプチドの標的ペプチド

C5a については、C5a の 37 番目から 52 番目のアミノ酸に渡る 17 個のアミノ酸からなるペプチド (PL37 と命名している) を標的とした。PL37 は、C5a レセプターに対して C5a のアゴニストとして働くと共に、PL37 を多価ペプチド (PL37-MAP) とすると C5a レセプター陽性細胞にアポトーシスを誘導するなど、生物活性を発揮する部位であることは、我々が既に発表したところである。設計合成した Pep-A に C5a 阻害活性が認められたので、Pep-A の N 末をアセチル化した AcPep-A を作成し、Pep-A よりも生体内での安定性が高いことを期待した。

C5a によるカルシウムインフラックス

ヒト血液から、好中球と単核白血球を比重遠心法で分画採取し、混入した赤血球を溶解除去し、Hanks' buffered salt solution で各々 $2 \times 10^7/\text{ml}$ に調製した。C5a を添加してカルシウムインフラックスを起こす実験系で、C5a を相補性ペプチドと氷上で 30 分間反応させて、C5a の作用に対する影響を調べた。

ProCPR ノックアウトマウスの作成

ノックアウトマウスを作成するにあたって必要なのはノックアウトする部分を欠損させネオマイシン耐性遺伝子に置き換えたターゲティングベクターを作成することである。この際、ゲノム上の proCPR 遺伝子がどの制限酵素でどこが切れるのかをはっきりさせなければベクターを作成することができない。そこで proCPR 遺伝子を含んだプラスミドを使って制限酵素マップを作成した。

各クローンを各種の制限酵素で切断、電気泳動により各フラグメントの長さを確認しマッピングを行った。さらに泳動したゲルをナイロンメンブレンに転写して、各エクソンに含まれるオリゴヌクレオチドを T4 ポリヌクレオチドキナーゼに

より 5'末端を RI 標識してサザンハイブリダイゼーションを行った。この結果を利用してマッピングを完成させた。

ノックアウトマウスを作るためには ES 細胞にターゲティングベクターを導入して変異 ES 細胞を作る必要がある。導入されたベクターが ES 細胞のゲノムに組み込まれるときの仕組みは遺伝子の相同組み換えを利用している。そのためネオマイシン耐性遺伝子の両側には ES 細胞のゲノムと相同部分をつなげたベクターにする。このとき、一方の相同部分は 1 kb 前後としてベクターが組み込まれたかどうかを確認するための PCR で増やせるようにしておく。また相同組み換えの頻度がかなり低いので、ES 細胞にベクターが正しく組み込まれたときにだけ生き残るようにベクターにはポジティブセレクションのためのネオマイシン耐性遺伝子とネガティブセレクションのためのチミジンキナーゼ遺伝子を入れてある。ネガティブセレクションの意味は、もし相同組み換えではなく非特異的な部位にベクターが挿入された場合はチミジンキナーゼ遺伝子も同時に挿入されチミジンキナーゼが発現する。ガンシクロビル添加選択培地の中ではこの発現したチミジンキナーゼがガンシクロビルを活性化 (リン酸化) し、DNA 合成を妨げ死滅してしまうという原理を利用した。

ノックアウトマウスを作成するにあたって必要なのはノックアウトする部分を欠損させネオマイシン耐性遺伝子に置き換えたターゲティングベクターを作成することである。この際、ゲノム上の proCPR 遺伝子がどの制限酵素でどこが切れるのかをはっきりさせなければベクターを作成することができない。そこで proCPR 遺伝子を含んだプラスミドを使って制限酵素マップを作成した。

胚盤胞へのマイクロインジェクション～キメラマウス誕生までのプロセスはすべて日本エスエルシー株式会社受託試験部に依頼した。エスエ

ルシーに送った凍結クローンは CPR8E14, CPR14E14, CPR37E14, CPR61E14, CPR82E14 の計5クローンである。エスエルシーで実施した概要を以下に示す。

過排卵処理を受け、交配したメスの C57BL/6 マウスから胚盤胞を取り出す。同時に凍結保存していた ES 細胞クローンを起こして培養しておく。状態の良好な胚盤胞約60個に変異体 ES 細胞を各20個ほどマイクロインジェクションする。インジェクション後の胚盤胞は仮親の子宮へ移植する。仮親は精管結紮を行ったオスの ICR マウスと交配させたメスの ICR マウスを使用した。産後は離乳するまで育ててから名市大医学部実験動物研究教育センターへ移した。

C. 研究結果

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。Pep-A が生体内で不安定であるためであると考えられた。更に、ラットにエバンスブルーを静注しておき、その皮内に抗 Crry 抗体を投与すると局所炎症反応によりブルーのポットが現れる。抗 Crry に Pep-A を混ぜ

ておいても局所反応を抑制することはできなかった。しかし、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ビ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 の遺伝子をノックアウトしたマウスの作成については、PCR を用いての解析において、完全に欠損したマウスができたことを確認した。さらに、そのマウスの血清中のカルボキシペプチダーゼ活性を解析し、ProCPR 活性が消失していることも確認できた。

この、ProCPR 欠損マウス (ProCPR^{-/-}) に LPS を投与した翌日に生体内の補体を協力的に活性化させる 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。

D. 考察

細菌感染部位において補体は微生物の侵入に反応する最初のシステムである。活性化した補体は、好中球の局所集積や活性化を司るアナフィラトキシン C5a を生成する。この 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。ラットを用いた実験や、マウスを

用いた実験で、Pep-A の N 末をアセチル化した AcPep-A は Pep-A よりも生体内での安定性が高く Pep-A よりも優れた効果を発揮できることが示唆された。そこで、Pep-A や AcPep-A をヒトの多臓器不全や敗血症などの重篤な病態に陥った患者の治療への応用に向けてのサルでの動物実験や種々の安全性試験も実施したい。17 アミノ酸から成るペプチドであるので、生体内では速やかに分解されてしまうと考えられる。多臓器不全や DIC の患者の救命のために大量投与を行っても炎症病態が改善できた段階で投与を中止すれば、ペプチドは速やかに分解され、蓄積毒性などによる副作用の懸念がすくないので臨床応用にはかえって便利な薬剤となりうるだろう。

炎症は器官の恒常性維持のため、いくつかの段階で制御されるはずである。好中球が感染部位に集積して活性化され炎症反応の形成増幅に働くと共に、proCPR から CPR を変換する酵素を放出し、過剰な炎症反応を抑制するネガティブフィードバックシステムにも役割を果たす。炎症部位において活性化された好中球が放出するエラスターゼの働きにより proCPR を CPR に活性化し過剰な炎症反応の抑制にも寄与すると考えられる。血液凝固反応や炎症時には、Prothrombin が Thrombin に活性化され、この Thrombin は炎症組織から遊離した TM と複合体を形成して極めて強力な proCPR 活性化作用を持つ。これも強力な炎症抑制機序として働くと考えられる。このような作用はエラスターゼによる炎症抑制作用と一体となって炎症の過剰反応を防いでいると考えられる。しかし、CPR は血栓溶解を防ぎ、多臓器不全や DIC 等の病態を亢進させる可能性もある。このような生体内での CPR の役割を明らかにする動物実験モデルに活用するために ProCPR の遺伝子をノックアウトしたマウスを作成した。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てよいだろう。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。

E. 結論

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。これらを多臓器不全、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。

F. 健康危険情報

SPF マウスを用いた動物実験と、ヒトや動物から採血した血液等を用いた試験管内実験であるので、実験者などの人に対して特に健康などに危険を及ぼす恐れはない。

G. 研究発表

論文発表

- 1) Fujii, Y., Murase, Y., Otake, K., Yokota, Y., Omoto, S., Hayashi, H., Okada, H., Okada, N., Kawai, M., Okuyama, H. and Imakawa, K. A potential live vector, foamy virus, directed intra-cellular expression of ovine interferon- γ exhibited the resistance to HIV infection. *J. Vet. Med. Sci.* 66: 115-121 (2004)
- 2) Farkas, I., Takahashi, M., Fukuda, A., Yamamoto, N., Akatsu, H., Baranyu, L., Tateyama, H., Yamamoto, T., Okada, N. and Okada, H. Complement C5a receptor-mediated signalling may be involved in neurodegeneration in Alzheimer's disease. *J. Immunol.* 170: 5764-5771 (2003)
- 3) Tani, S., Akatsu, H., Ishikawa, Y., Okada, N. and Okada, H. Preferential detection of procarboxypeptidase R by enzyme-linked immunosorbent assay. *Microbiol. Immunol.* 47: 295-300 (2003)
- 4) Shimomura, Y., Kawamura, T., Komura, H., Campbell, W., Okada, N. and Okada, H. Modulation of procarboxypeptidase R (proCPR) activation by complementary peptides to thrombomodulin. *Microbiol. Immunol.* 47: 241-245 (2003)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

- 1) 「アナフィラトキシン C5a を不活性化するペプチド」特願 2003-44850（平成 15 年 2 月 21 日）出願人：岡田秀親・岡田則子
- 2) 「トロンボモジュリンを不活性化するペプチド」(平成 15 年度 2 月 28 日出願)出願人：

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

分担研究者 笹田昌孝 京都大学医学部保健学科教授

研究要旨

好中球アポトーシスの機序の1つとして、X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP)に注目して解析した。カルパインがXIAPを分解すること、XIAPは分解を受けるとカスパーゼ3を抑制する作用を失うことを確認した。カルパインを阻害すると、TNF α で誘導される好中球アポトーシスを遅延させた。カルパインは好中球において常時XIAPを分解することによりXIAPの作用であるカスパーゼ3阻害を減弱させており、アポトーシス刺激によるカスパーゼ3に始まるカスケード活性化を促進すると考えられた。

A. 研究目的

好中球は活性酸素産生放出を介して殺菌能を発揮することにより生体防御に中心的役割を果たす一方、この機能が不適切に発現すると組織傷害等を起こすことになる。好中球の機能を制御する機構の1つとしてアポトーシスがある。仮にアポトーシスが遅延すると、好中球の機能は持続することとなり、組織傷害や血管炎を誘導する可能性がある。これまで炎症性サイトカインの1つ、GM-CSFは好中球アポトーシスを抑制すること、そしてその機序の一部並びに好中球の機能の変化について明らかにしてきた。好中球アポトーシスは血管炎の病態と深く関わると考えられるため、好中球アポトーシスの機序を解明する計画を立てた。

B. 研究方法

1. 好中球分離

好中球は、正常人ボランティアの血液よりパーコール遠心法を用いて分離した。分離した好中球は二時間以内に各処理を開始した。

2. アポトーシス誘導

分離した好中球を10% FCSを混じたRPMI1640

に 1×10^7 /mlとなるように浮遊させた。TNF- α によるアポトーシスは、好中球浮遊液にTNF- α およびcycloheximide (CHX)を最終濃度としてそれぞれ10 IU/ml、10 μ g/mlとなるように加え、5%CO₂インキュベーターにて3時間培養して誘導した。阻害剤を用いる場合は、一時間前処理した後TNF- α およびCHXを加えた。自発的アポトーシスは、好中球浮遊液をそのまま、あるいはサイトカイン存在下でCO₂インキュベーターにて24あるいは48時間培養して誘導した。培養容器はすべてポリプロピレン製のものをを用いた。

3. アポトーシスの評価

好中球アポトーシスは、propidium iodide (PI)を用いたDNA断片化を指標として評価した。200 μ lの好中球浮遊液(2×10^8 cells)、を遠心後、70%エタノールに懸濁し-20°Cで2時間固定して洗浄後、RNaseで処理した。次にPBSに懸濁し、PI(最終濃度5 μ g/ml)を加えて暗冷所にて30分間DNAを染色し、フローサイトメトリーにて解析した。

4. immunoblotting

好中球を10%TCAで固定した。好中球をSDS

buffer 中で boil して得られた extract を immunoblotting に供した。

5. カルパイン活性

カルパイン活性測定用基質を用いて、カルパインにより生じる産物を蛍光光度計により測定した。

(倫理面への配慮)

正常ヒト末梢血の採取については、倫理規定に沿った手順で行った。

C. 研究結果

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 の消失が Western Blot 法にて確認された(図 1)。この変化はカルパイン阻害剤であるカルペプチン、あるいはカスパーゼ阻害剤である z-VAD-fmk により阻害された。z-VAD-fmk はカルパインも阻害しうることで、好中球をカルシウムイオノフォアで刺激しカルパイン活性を上昇させると XIAP の消失が認められること、さらに *in vitro* で μ 、 m カルパイン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、好中球をカルペプチンで前処理すると、TNF α 誘導アポトーシスは抑制された(図 2)。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、カルパインによる XIAP 切断片は *in vitro* にてカスパーゼ 3 活性抑制能を減弱させること、更にカスパーゼ 8 によるカスパーゼ 3 の活性化阻害能を減弱させることから、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。

D. 考察

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。

E. 結論

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。

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nishioka M, Arai T, Yamashita K, Sasada M, Mori H, Ishii H, Tajima K, Makino K, Fukuda K: Effects of 6-formylpterin as an internal source of hydrogen peroxide on cell death of human peripheral blood leukocytes. *Life Science*, 73(2):221-231, 2003.
- 2) Ohno T, Ueda Y, Nagai K, Takahashi T, Konaka Y, Takamatsu T, Suzuki T, Sasada M, Uchiyama T, members of the Kyoto University Hematology/ Oncology Study

Group: The serum cytokine profiles of lymphoma-associated hemophagocytic syndrome: a comparative analysis of B-cell and T-cell/natural killer cell lymphomas. *Int J Hematol*, 77(3): 286-294, 2003.

3) 笹田昌孝：好中球と病態形成－好中球の二面性－. *臨床血液*, 44(6):351-357, 2003.

2. 学会発表

1) 平田大二, 伊藤洋志, 山田紘子, 山本孝吉, 内山卓, 笹田昌孝：プリン誘導体が有する好中球アポトーシスおよび諸機能修飾作用の解明. 第65回日本血液学会総会, 2003.8.28-31, 大阪, *臨床血液*, 44(8):820, 2003.

2) 山田紘子, 荒井俊之, 高橋 淳, 笹田昌孝, 内山卓：敗血症ショックに有効なPBNの機序解析－樹状細胞、単球におけるPBNの作用機序. 第65回日本血液学会総会, 2003.8.28-31, 大阪, *臨床血液*, 44(8):866, 2003.

3) 笹田昌孝, 山田紘子, 山本孝吉：白血球内細菌に対する抗菌薬の効果. 第46回日本感染症学会中日本地方会総会, 2003.11.8, 京都, 第46回日本感染症学会中日本地方会総会プログラム・抄録集, 25頁.

4) 伊藤洋志, 平田大二, 山下浩平, 笹田昌孝：好中球の機能制御における Purines －好中球の諸機能修飾作用－. 第37回日本痛風・核酸代謝学会総会, 2004.2.5-6, 米子, 第37回日本痛風・核酸代謝学会総会プログラム・抄録集, 68頁.

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし

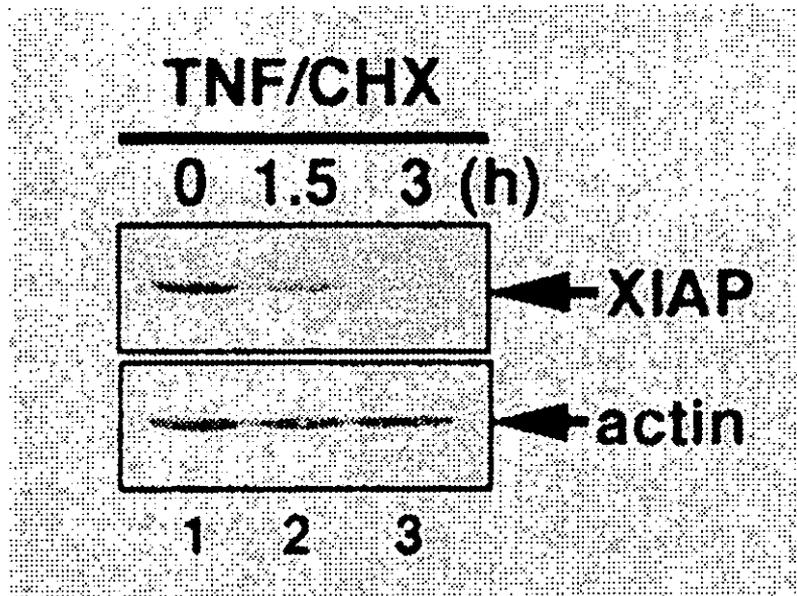


図1 好中球アポトーシスに伴うXIAPの消失

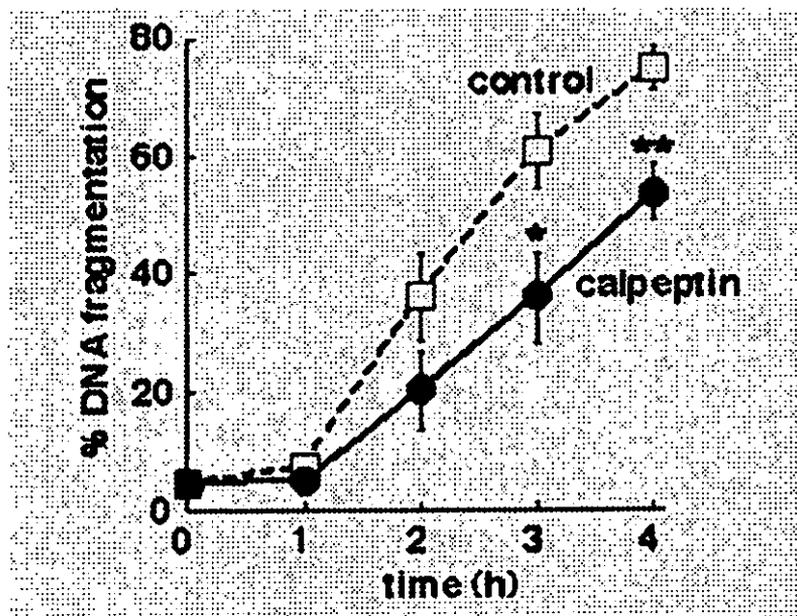


図2 カルペプチンによる好中球アポトーシスの抑制

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患対策研究事業）
分担研究報告書

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

分担研究者 木村暢宏 福岡大学病院講師

研究要旨

免疫系の立場からMOFへ陥る状態を検討した。高サイトカイン状態から一部MOFとなるが、これには免疫不全の有無が関係する。現在、1) TCR多様性低下/オリゴクローン性T細胞出現、2) NKT細胞の欠如・増加、3) 制御性T細胞の欠如（低下）など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。また、VAHSやMOFの危険因子として制御性T細胞著減が挙げられた。この治療に、早期の免疫抑制剤使用と将来の制御性T細胞療法が期待できる。

A. 研究目的

免疫の立場から、肝臓をはじめ多臓器の機能不全・機能異常あるいは臓器障害の劇症化の早期診断と劇症化への移行を克服するための病態解明と治療法の開発をめざす。多臓器不全の発症機構の解明として、免疫系の異常を（1）サイトカイン系の機能不全、（2）免疫系の機能不全、（3）遺伝性疾患や感染により誘発される疾患の病態を解析する。

これまで、MOF準備状態やMOF死亡例ではTCR多様性欠如やNKT細胞の減少が高頻度みられ、またMOFにいたる免疫異常の違いがみられた。本年度は、免疫を制御する制御性T細胞（T-reg）をFoxp3発現から検討した。さらにTリンパ球のTh1/Th2をコントロールするとされるNKT細胞も検討した。

B. 研究方法

1. 者の検体：肝炎後再生不良性貧血（含む劇症肝炎）、perforinn異常FHL、VAHS、分類不能型免疫不全症（CVID）例、SIRS、MOF例などを検討した。

臨床各病期に患者より末梢血（PB）や骨髓液（BM）を採取し、フイコールによる比重遠心法にて単核細胞群（MN）を分離回収し、RNAを抽出した。

2. TCR Vレパートリーの解析：我々の開発した簡略化 inverse PCR 法をもちいて、サンプルRNAをcDNAとし、さらにligationし、それぞれ2種類のプライマーを用いてPCRを行い、TCR α 鎖や β 鎖の未知の割合の可変部（V）領域を均等に増幅。Vを含む一部の遺伝子産物を³²P-dCTPでラベルし、20種類のヒトV β 遺伝子やV α 遺伝子が敷かれたフィルター上でプロットを行う。濃度測定器で計測し、各Vレパートリーを%で表現した。
3. V β レパートリーのJ β 遺伝子を13種類のプライマーを作成、V-J β PCRを行い、多様性を検討した。
4. 上記PCR増幅産物のクローン性を検討するためにSSCP法によりバンドの有無を検討した。
5. SSCP法によりバンドを認めた場合、TC

Rの direct sequencing により C D R 3 領域の塩基配列を決定し、T細胞の TCR clone の特異的 clonotypic primer を作成した。

6. NKT 細胞 (TCR Vb 11/Va 24JQ) の検討は、Va 24 中の NK T細胞の割合を、RT-PCR 法にてとして Va 24 プライマー (sense), antisense として JaQ と Ca プライマーを作成し 比較検討した。
7. 希釈法による半定量的検討で微小 T細胞クローン量を算定する。
8. 制御性 T細胞特異的 Foxp3 遺伝子の発現を検討した。

(倫理面への配慮)

T C R 遺伝子を解析する対策として患者からのインフォームド・コンセントを得る。骨髓・末梢血よりリンパ球細胞分画を採取し、Tリンパ球が細胞性免疫として働く T細胞抗原受容体 (T-cell receptor, TCR) 遺伝子の発現状態を分析することで、特定のクラスの Tリンパ球の増減が病態に影響しているかどうかを研究する理由を説明する。この研究への参加は自由で、参加しなくても不利益は受けないこと。プライバシーや医療記録は守秘されること。決して、本人や家族・血縁者に損害が及ぶことがないことを制約、成績の公表前であればいつでも参加を取り下げる事ができること。また、今後この疾患と関わる遺伝子が判明した場合、T C R 遺伝子以外の遺伝子を研究することがある事などを記載した同意文書を作成し、同意文書に自署による署名を得る。既提供試料で同意が与えられていなかったものは、今回の同意文書に承認されたもののみを使用する。既提供試料で患者自身が死亡している場合は、倫理委員会の承認を得られた場合に限り使用する。

C. 結果

- 1) 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(表 II)。

- 2) MOF や準備状態で Foxp3 発現の欠如・減少傾向を認めている(表 II)。
- 3) 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(表 I)。
- 4) 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(表 II)。

D. 考察

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かどうか検討の必要性あり。今後の制御性 T細胞療法を目標としたい。

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 Treg 増殖法の開発と制御性 T細胞療法を試みたい。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

特記なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Zhang Y, Nagata H, Ikeuchi T, Mukai H, Oyoshi MK, Demachi A, Morio T, Wakiguchi H, Kimura N, (他 2 名, 9 番目). Common cytological and cytogenetic features of Epstein-Barr virus (EBV)-positive natural killer (NK) cells and cell lines derived from patients with nasal T/NK-cell lymphomas, chronic active EBV infection, and hydroa vacciniforme-like eruptions. *Br J Haematology* 121:805-814, 2003.

2) Oyoshi MK, Nagata H, Kimura N, (他 10 名, 3 番目). Preferential expansion of $V\gamma\text{-}J\gamma\text{P}/V\delta\text{-}J\delta\text{3}\ \gamma\delta\text{-}T$ cells in nasal T-cell lymphoma and chronic active Epstein-Barr virus infection. *Am J Pathol* 162 (5):1629-1638, 2003.

3) Demachi A, Nagata H, Morio T, Oyoshi MK, Zhang Y, Tabata N, Kimura N, (他 2 名, 7 番目). Characterization of Epstein-Barr virus (EBV)-positive NK cells isolated from hydroa vacciniforme-like eruptions. *Microbiol Immunol* 47(7):543-552, 2003.

4) Ishii E, Yasukawa M, Kimura N, Yamamoto K, Imashuku S. Current review on the pathogenesis of primary hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Recent Res. Devel. Haematol.* 1:13-25, 2003.

5) 特集 II. 血球貪食症候群：遺伝性（家族性）血

球貪食症候群の異質性. 石井栄一、木村暢宏、他 2 名. 炎症と免疫 11 巻 3 号: 296-301, 2003 年.

2. 学会発表

1). ランゲルハンス細胞組織球症における病巣内 T 細胞のオリゴクローナリティー. 木村暢宏、他 5 名.

第 65 回日本血液学・会第 45 回日本臨床血液学会（於大阪）平成 15 年 8 月 28 日-31 日

2). LGL 増多を呈し MOF で死亡した Perforin 遺伝子異常の FHL における $\alpha\beta\text{-}T$ 細胞クローンの解析. 迫正廣、木村暢宏、他 4 名. 第 65 回日本血液学・会第 45 回日本臨床血液学会（於大阪）平成 15 年 8 月 28 日-31 日

3). 成人 T 細胞性白血病 (ATL) に対する骨髄非破壊的同種末梢血幹細胞移植術の検討. 岡村 純、宇都宮 宮典、田野崎隆二、鷗池直邦、園田俊郎、神奈木真理、朝長万左男、原田実根、木村暢宏、他 6 名. 第 65 回日本血液学・会第 45 回日本臨床血液学会（於大阪）平成 15 年 8 月 28 日-31 日

4). Rituximab 投与後に細胞障害性 T 細胞と考えられる CD8 陽性大型リンパ球増多を来した非ホジキンリンパ腫の一例. 小川亮介、塚田順一、町田真一郎、東丈裕、岩重淳司、河野一郎、太田貴徳、窪田歩、木村暢宏、田中良哉. 第 65 回日本血液学・会第 45 回日本臨床血液学会（於大阪）平成 15 年 8 月 28 日-31 日

5). $\alpha\beta\text{-}T$ 細胞腫瘍の MRD の検討：とくに ATL について. 木村暢宏、他 6 名. 第 62 回日本癌学会総会（於名古屋）平成 15 年 9 月 25 日-27 日

6). 四倍体の異常核型を有する縦隔原発 lymphoblastic lymphoma 細胞株の樹立と解析. 一瀬一郎、木村暢宏、他 2 名. 第 62 回日本癌学会総会（於名古屋）平成 15 年 9 月 25 日-27 日

7) Clonality analysis of lesional $\alpha\beta\text{-}T$ cells in

patients with langerhans cell histiocytosis(LCH). Sako M, Kimura N, et 4 persons. The 19 annual meeting of the histiocyte society.(Philadelphia, USA, Sep 10-12, 2003)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特記なし。
2. 実用新案登録
特記なし。
3. その他
特記なし。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

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

分担研究者 関塚永一 国立埼玉病院副院長

研究要旨

LECT2 (leukocyte-cell derived chemotaxin 2) は好中球遊走活性を制御するサイトカインとして近年国立感染研究所で発見された。しかし、その主たる産生臓器である肝における詳しい働き、肝疾患との関連については未だに明らかな結論を得ていない。我々は臨床的に肝疾患と LECT2 との関連について当院でのさまざまな症例の LECT2 値を測定し、LECT2 が肝炎症反応を抑えさらには回復に関与している可能性、またアルコールを摂取後に LECT2 値が上昇することを明らかにした。特に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が示唆された。さらに *in vivo* の実験で LECT2 が肝類洞においてクッパー細胞の貪食を制御している可能性を見出した。

A. 研究目的

LECT2 は肝細胞により特異的に発現し産生され、好中球遊走活性を制御する分子量 16Kda のサイトカインとして近年国立感染研究所で発見された。魚からヒトまで生物種を超え広くその存在が確認されており線虫にも相同性を示す遺伝子がコードされている。In vitro の実験では好中球遊走活性を制御することに加え、軟骨細胞や骨芽細胞の増殖促進を行い、臨床的には慢性関節リウマチの重篤度によって動揺することも明らかになっている。その主たる産生臓器である肝における詳しい働き、肝疾患との関連は現時点では不明で、それを明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

ヒト LECT2 値は ELISA 系を用いた測定が医学生物学研究で開発されており、正常値は 10ng/ml である。急性肝炎、肝硬変の急性増悪、劇症肝炎といった肝疾患の急性期において LECT2 値の推移を測定、検討した。また、前提として LECT2 値に日内変動がないことを確認した上で GOT, GPT, γ -GTP, 血小板数, 肝線維化マーカーといった種々のメルクマールと肝疾患を中心とした 218 症例の随時 LECT2 値との相関係数を取りそれらとの関連性につき検討した。さらに健常人においてアルコールを摂取前後での LECT2 値につき検討した。In vivo においてはクッパー細胞の機能と LECT2 の関連を明らかにするために以下の実験を行った。野生型と LECT2 KO マウスにおけるクッパー細胞の貪食能の差異を LPS の刺激下で検討した。

野生型と LECT2 KO 各々3匹 (BALB/c 25~30g) に Indian Ink を 0.1ml ずつ、一方のグループには Indian Ink のみを、また他方には LPS(1.25、2.5、5mg/Kg の各濃度において) 静注 30 分後に同量の Indian Ink を尾静脈より投与し 15 分後に犠牲死させ、肝臓を取り出し固定した後貪食された 40 倍視野内での Ink 数をカウントした。

(倫理面への配慮)

LECT2 測定のための採血において、その目的について十分な説明を行い、了解を得た上で施行した。

C. 研究結果

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 1~3)。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 -GTP に有意差をもった若干の相関が見出された (表 1)。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 4)。In vivo の実験においては Indian Ink のみの control の状態では、LECT2 KO マウスにおいて貪食された Ink 数の低下が観察され、LPS をあらかじめ静注していた場合も同様に LECT2 KO マウスにおいて貪食数の低下が観察された。しかし低下の比率には両条件下に違いは認められなかった。(図 5) また、LPS 濃度を変えて観察しても低下の比率には差異は認められなかった。

D. 考察

国立感染症研究所で行われた Con A 肝障害モデルにおいて、野生型マウスに比較し LECT2 のノックアウト (KO) マウスで肝障害が重症化し死に至り易く、さらに肝中 LECT2 mRNA、及びたんぱく質は肝障害が認められる 8hr に発現が減少し、回復に伴い再度発現がみられ LECT2 が肝炎症反応を抑えている可能性が明らかになっている。また、LECT2 KO マウスでは Con A 静注後 1~2hr に TNF- α 、IFN- γ 、IL-6、IL-10 といった炎症性サイトカインには差がないものの IL-4 の発現が野生型に比べて高くなっており、フローサイトメトリーにより LECT2 KO マウスの肝臓には野生型の約 2 倍の CD3int NK1.1+(NKT) 細胞が含まれていることがわかった。これらの結果から LECT2 の機能として NKT 細胞の分化増殖の機能調節をしている可能性も示唆されている。また新潟大学第一外科のグループにより肝移植におけるヒト LECT2 値の検討がなされており、ドナーにおいては肝移植後 3 時間後ぐらいより LECT2 値は 0 を示し 24 から 48 時間後より徐々に回復してきており、一方レシピエントにおいてはドナーに比し、移植後 12 時間ぐらい後より同じく 0 を示しこちらは遅れて 72 時間後ぐらいよりゆっくり回復してきている。今回の結果において肝疾患の急性期に 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 が肝炎症反応を抑え、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