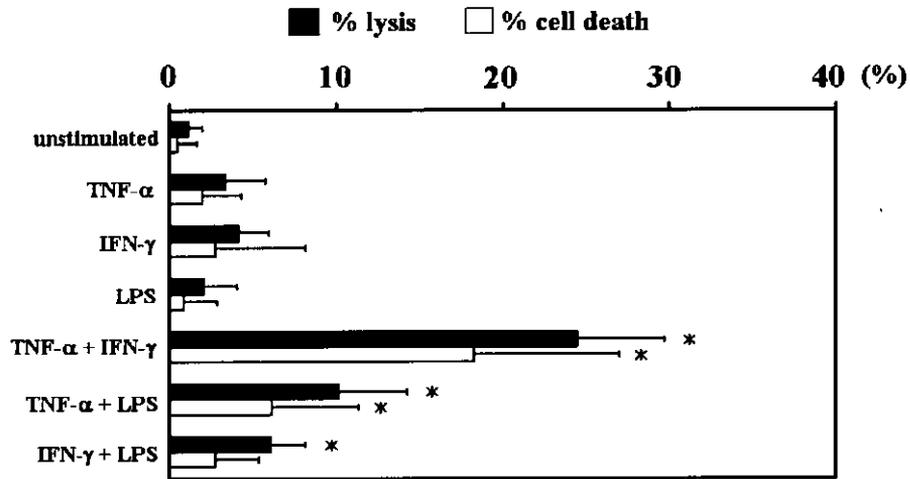
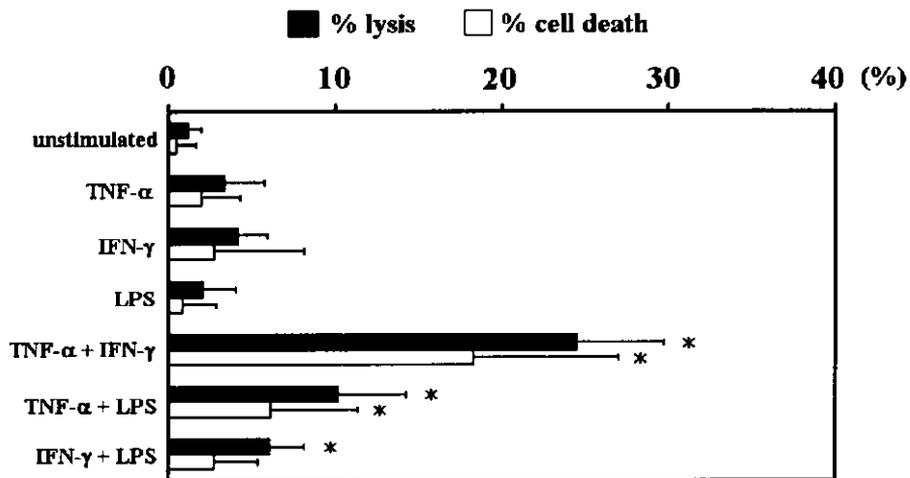


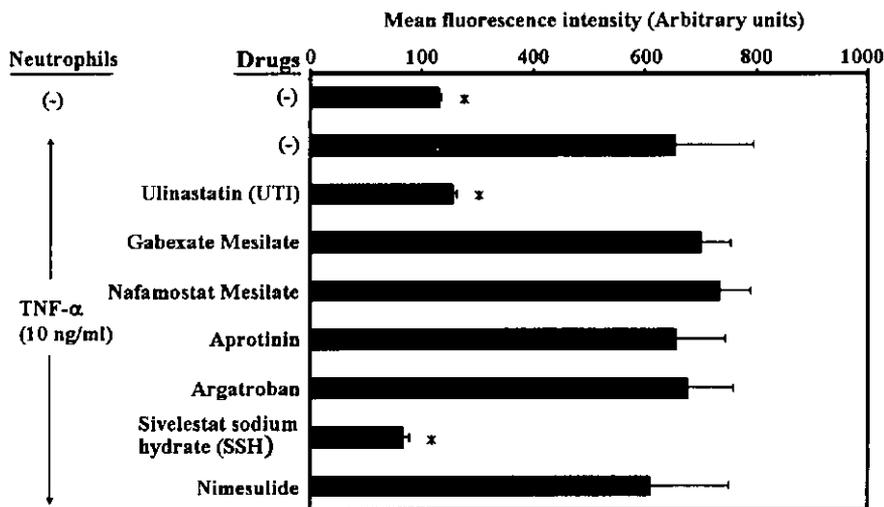
⊠1 Effect of preincubation with TNF- α , IFN- γ and/or LPS on the % lysis and % cell death of HUVEC mediated by TNF- α -primed neutrophils.



⊠2 Effect of neutrophil-priming by TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , LPS, fMLP or PMA on the % lysis and % cell death of TNF- α +IFN- γ -preincubated HUVEC.



☒3 Inhibitory effect of protease inhibitors and nimesulide on % lysis of ⁵¹Cr labeled-HUVEC mediated by neutrophils.



☒4 The fluorescence staining of neutrophils for intracellular elastase activity using a confocal laser microscope.

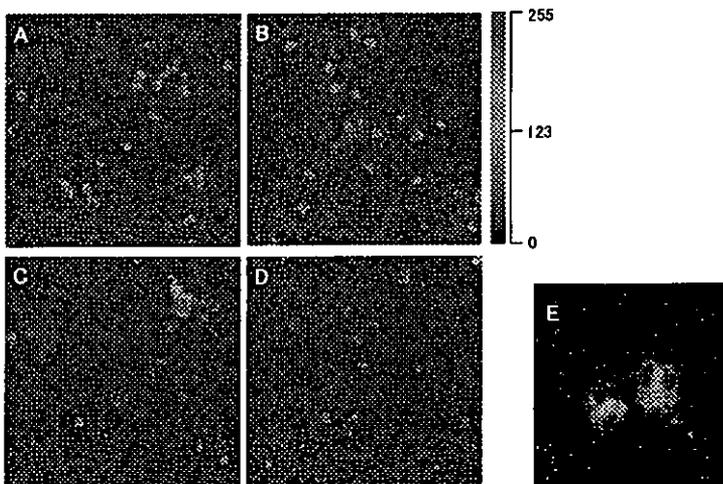


図5 Inhibitory effect of UTI and SSH on the intracellular elastase activity in TNF- α -primed neutrophils using a confocal scan laser microscope.

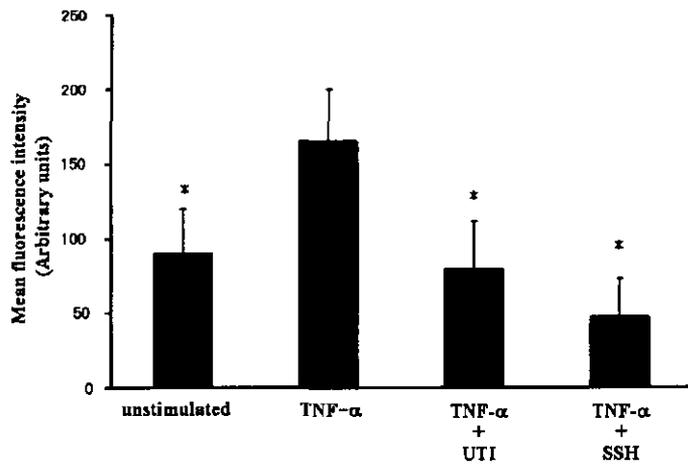
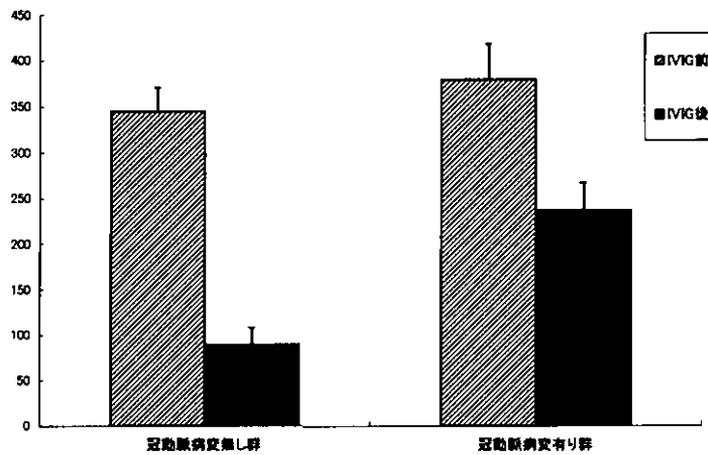


図6 KD 患児の IVIG 治療前後の血中エラスターゼ値の推移



多臓器不全因子(LECT2)の構造解析

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）
研究協力者 小田 佳史、伊藤 三恵、鈴木 倫太郎、永田 宏次

研究要旨

慢性関節リウマチ患者においては、疾病の重篤度が高い患者ほど LECT2 の 58 番目の Val 残基が Ile 残基に置換されている割合が高いことが明らかにされている。本研究では、サイトカイン LECT2(leukocyte cell-derived chemotaxin 2)の高次構造解析を、核磁共鳴スペクトル(NMR)と X 線結晶構造解析を用いて行い、LECT2 の機能発現に 58 番目の Val 残基のメチレン基 1 つ分の役割がいかに重要かを明らかにし、LECT2 とリウマチとの因果関係を突きとめることを目的としている。

- (1) NMR を用いた高次構造解析については、安定同位体標識したサンプル調製法の確立と NMR 測定とスペクトルの解析を行った。現在までのところ、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。
- (2) X 線結晶構造解析については、動物細胞による発現系を用いて前年度から引き続き進めており、結晶化条件の精密化を行って得られた結晶等を用いて X 線回折強度測定を行った結果、より良い分解能のデータを得ることができた。

A. 研究目的

慢性関節リウマチ患者においては、疾病の重篤度が高い患者ほど、LECT2 の 58 番目の Val 残基が Ile 残基に置換されている割合が高いことが明らかになっている (Kameoka, Y., et al., *Arthritis & Rheumatism* 43, 2000)。58 番目の Val 残基が受容体との結合に関わっているか、もしくは LECT2 自体の立体構造を維持するために重要な役割を果たしている事が考えられる。現在では、LECT2 の立体構造が明らかでない為に、メチレン基 1 つ分が LECT2 の機能発現にいかに重要か特定できていない。58 番目の Val 残基の役割を明らかにし、LECT2 とリウマチとの因果関係を突きとめる為には LECT2 の立体構造を明らかにする必要がある。本研究では、野生型 LECT2 の高次構造と、Ile 型 LECT2 の高次構造解析、更

には、受容体ペプチドとの複合体の高次構造を明らかにすることを目的としている。

B. 研究方法

(1) 大腸菌による発現系を用いた NMR 溶液構造解析

構造解析に足りるだけの量を血清中から精製するのはコスト、時間の面で問題があるため、前年度までに大腸菌を宿主とし N 末端に(His)₆-tag を付加した発現プラスミドを用いた大量発現系を構築した。(His)₆-LECT2 は不溶性画分に発現するので、封入体からの可溶化、巻き戻しを行っている。これは、不溶性タンパク質に 8 M 尿素を添加して可溶化し、Ni-NTA-agarose カラムに結合させたまま尿素濃度をゆっくり下げる Ni-NTA-agarose カラム法を行った後、間違っ

S-S 結合をかけ直すために、酸化型グルタチオン/還元型グルタチオン混合溶液中で、穏やかに Ni-NTA agarose カラム上に固定した (His)₆-LECT2 を攪拌し、樹脂からの溶出後更に一週間の空気酸化を行うものである。

以上の系を用いて、¹⁵N および ¹³C/¹⁵N で標識した (His)₆-LECT2 を調製し、3核3次元 NMR の測定と解析を行った。天然型立体構造を持つタンパク質に特徴的な分離の良いスペクトルが得られ、50 mM 硫酸ナトリウム存在下で測定したスペクトルを帰属した。

(2) CHO 細胞による発現系を用いた X 線結晶構造解析

CHO 細胞を宿主とし、高発現プロモーター制御下で遺伝子を発現させる系(Yamagoe, S., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237, 1997) を用いて LECT2 を培養上清に分泌させた。遠心分離により沈殿物を取り除いた後、①陽イオン交換クロマトグラフィー(CM sepharose FF)による濃縮、②陰イオン交換クロマトグラフィー(DEAE sepharose FF)を素通りさせることによる夾雑タンパク質の除去、③陽イオン交換クロマトグラフィー(CM sepharose FF)からの 0-700 mM NaCl を用いたリニアグラジエントによる溶出、を順に行うことによって精製した。最終的には SDS-PAGE においてほぼ単一バンドとなる純度まで精製することができた。収量は 1L 培養液あたり数 mg 程度であった。

前年度までの研究の結果得られた結晶化条件をもとに作成された結晶を用い、高エネルギー加速器研究機構の放射光施設(PF)のビームライン BL6A, BL12B 等にて X 線回折強度測定を行った。(倫理面への配慮)

本研究は in vitro での実験が主であるが、組換え DNA を用いた実験については「組換え DNA 実験指針」に基づき、これを遵守した。

C. 研究結果

(1) 測定した 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することができた。そこで、化学シフトの値について BioMagResBank (BMRB) に登録を行い、現在は論文を投稿中である。

(2) CHO 細胞による発現系を用いた X 線結晶構造解析

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った。

① タンパク質溶液 : 20 mg/ml (50 mM Na-phosphate (pH 7.5), 700 mM NaCl)、リザーバー溶液 : 0.01 M CoCl₂·6H₂O, 0.1M MES (pH6.5), 2.0 M ammonium sulfate、添加剤 : 40% glucose (実行濃度 1/10)、温度 : 15°C

② タンパク質溶液 : 20 mg/ml (50 mM Na-phosphate (pH 7.5), 700 mM NaCl)、リザーバー溶液 : 0.2 M Li₂SO₄·H₂O, 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5), 30 % w/v PEG 4000、温度 : 4°C

その結果、①については分解能 1.9 Å のデータセットが得られ、空間群 : P₄1₂1₂あるいは P₄3₂1₂、格子定数 : a = b = 63.2 Å, c = 59.8 Å, α = β = γ = 90° であり、②については分解能 1.7 Å のデータセットが得られ、空間群 : P₂1₂1₂1、格子定数 : a = 58.7 Å, b = 59.6 Å, c = 63.4 Å, α = β = γ = 90° であった。

D. 考察

(1) 今回の研究により、主鎖の帰属を完了することができた。さらに側鎖の帰属を完了することができれば、NOE データに基づいた原子間の距離制限情報や角度制限情報を用いて動力学計算を行い、三次元構造を決定することが可能であると思われる。

(2) X線結晶構造解析により三次元構造を決定するためには今回得られた回折データだけではなく、位相角を決定する必要がある。その方法としては、LECT2分子に適した重原子を化学結合させた結晶（重原子同型置換体結晶）を用いる重原子同型置換法か、LECT2分子内に存在する硫黄原子の異常分散を利用する単波長異常分散法(SAD)を試みるつもりである。これらの方法により位相を求めることができれば、構造計算を行い三次元構造を決定することができるだろう。

E. 結論

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。まだ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。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ito, M., Kato, Y., Nagata, K., Oda, Y., Yamagoe, S., Suzuki, K. and Tanokura, M. (2003)

Expression, oxidative refolding and characterization of six-histidine-tagged recombinant human LECT2, a 16-kDa chemotactic protein with three disulfide bonds.

Protein Expr Purif. 27, 272-8.

2. 学会発表

- 1) 小田佳史、伊藤三恵、山越智、山本健二、鈴木

和男、田之倉優 (2003.4.1-3)

好中球走化性因子LECT2のX線結晶構造解析。
日本農芸化学会 2003 年度大会講演要旨集 88、藤沢。

- 2) 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 (2003.7.17-18)

サイトカインLECT2のNMRおよびX線を用いた立体構造解析。

生体防御機能異常ワークショップ-2003-講演要旨集 1B-9、北海道。

- 3) Dawson, W. Ishida, M. Kameoka, Y. Yamagoe, S. Futamura, Y. Yamamoto, K. Tanokura, M. Suzuki, K (2003.12.10-13)

Structural determination of the LECT2 protein by combined experimental and computational strategies.

日本分子生物学会 63、神戸。

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

肝機能不全症解析：LECT2 ノックアウトマウス

分担研究者 山越 智 国立感染症研究所生物活性物質部主任研究官

研究要旨

LECT2 は主に肝細胞で産生される分子量 16 kDa の血清蛋白質である。In vitro の実験から LECT2 は好中球走化性活性、軟骨細胞や骨芽細胞の増殖促進等の生物活性を持つことが分かってきているが生体内での機能は不明である。そこで我々は、LECT2 の生体内機能を明らかにするために LECT2 ノックアウトマウスを作成し肝炎症モデルを用いて解析した。その結果、LECT2 ノックアウトマウスにおいて肝臓 NKT 細胞量の増加が観察され NKT 細胞障害活性の上昇、 α -GalCer 刺激での IL-4, IFN- γ の産生の上昇が見られた。さらに concanavalin A 誘導肝炎が重篤になり、NKT 細胞の FasL の発現増加をそれにともなうアポトーシスの増加が観察された。以上の結果は、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するものである。

A. 研究目的

LECT2 (leukocyte cell-derived chemotaxin 2) は、ヒト好中球に対して走化性を有する蛋白質として発見された肝臓で特異的に産生され、血中に放出される分子量約 16kDa のサイトカインである。これまでに好中球走化性活性、骨芽細胞および軟骨細胞の増殖促進活性、生体レベルではその遺伝多型が慢性関節リウマチの病態の進行と相関することが判明している。現在までに魚からヒトまで種を越えて広く保存されていることが分かっている。さらに *C. elegans* にも LECT2 に特徴的なモチーフをもつ蛋白質が見つかっており、LECT2 が生体機能に重要な働きをしている可能性が示唆されている。

本研究では、ヒトのウイルス性肝炎、自己免疫性肝炎に似た症状を示すことが知られている Con A 肝炎における LECT2 の作用機序を各種遺伝子改変マウスを使って、分子生物学的、生理学的、病理学的に解析することを目的にした。これらのメカニズムが判明すれば新しい治療方法等の開発につながると考えられる。

B. 研究方法

1) LECT2 遺伝子 KO マウスは、ES 細胞を用いた相同遺伝子組換えにより作製した。10 世代以上戻し交配し実験に供した。マウスの飼育は全て SPF 環境下で行った。

2) ノックアウトマウスを使った concanavalin A (ConA) 肝炎モデル
C57BL/6、BALB/c マウス (7 週齢) および同系統 LECT2 ノックアウトマウス (7 週齢) に Con A (10-25mg/kg) を尾静脈内投与して肝障害を誘発した。投与後、血清 GPT 活性の測定、血清サイトカイン量の測定、ならびに、摘出した肝臓より total RNA を抽出し、RT-PCR 法により各種サイトカインの mRNA を検出した。

3) 肝臓、胸腺、脾臓からのリンパ球分離
肝臓からのリンパ球分離は、摘出した肝臓を細切しステンレスメッシュ上ですりつぶし、35% Percoll 液を用いた比重遠心法により行った。胸腺・脾臓は、肝臓と同様にすりつぶし、溶血バッファーにて赤血球を除去し、リンパ球を得た。

4) Flowcytometry によるリンパ球の解析
各臓器より分離されたリンパ球は、T 細胞 (α

β 型 TCR 及び $\gamma\delta$ 型 TCR 細胞を含む)、B 細胞、NK 細胞、マクロファージ、好中球に対する標識モノクローナル抗体、NKT 細胞は標識 CD1d tetramer で染色し Flowcytometry で解析した。

6) 細胞障害活性

YAC-1 と B6 由来の胸腺細胞をターゲット細胞とし、 ^{51}Cr で標識した。希釈系列をとり肝臓 MNC を加えた後、 37°C で 4 時間保温後、上清中に遊離してきた ^{51}Cr を測定した。

5) 血清中サイトカインの濃度

各モデルマウスにおいて経時的に尾静脈から血液を採取し、血清を調製し pharmingen 社の ELISA キットにてサイトカイン濃度を測定した。

C. 研究結果

LECT2-KO マウスにおける肝 NKT 細胞の解析

フローサイトメトリーにより LECT2-KO マウスの肝臓 mononuclear cells (MNC) 画分における CD3int NK1.1⁺細胞の割合を調べた。その結果、LECT2-KO マウスは野生型に比べて約 2 倍の CD3int NK1.1⁺細胞を持つことがわかり NKT 細胞の増加を示唆した。一方、CD3⁻NK1.1⁺細胞 (NK cells)、及び CD3⁺NK1.1⁻細胞 (conventional T cells) の割合はほとんど差が見られなかった。また、胸腺、および脾臓の mononuclear cells 画分では NKT 細胞の割合は変わらなかった。T 細胞抗原受容体 V α 14-J α 281 を発現する NKT 細胞は、CD1d を発現する抗原提示細胞により制御を受ける。そこで NKT 細胞の増加を確認するために CD1d tetramer で染色し解析した。その結果 CD3int NK1.1⁺細胞で得られた結果とほぼ同じ結果が得られた。このことより LECT2-KO マウスでの肝臓 NKT 細胞の増加が明らかとなった。さらに NKT 細胞の細胞障害性活性を調べるため肝臓より単核球画分を調整し胸腺細胞に対する細胞障害活性を調べた。その結果、LECT2-KO マウスから調整した肝臓 MNC において活性が増加していた。糖脂質抗原 α -galactosylceramide (α -GalCer) は、NKT 細胞を活性化し多量の IFN- γ , IL-4 を産生する。

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、野生型とほとんど差が見られなかったが、IL-4 産生は約 2 倍多く誘導された。さらに、肝臓から mononuclear cell 画分を調製し in vitro で α -GalCer 刺激をしてもマウス個体を用いて得られた場合とほぼ同様の結果がえられた。以上のことより LECT2-KO マウスでは肝臓の NKT 細胞が増加し、その結果肝臓での NKT 細胞の活性の亢進が予想された。LECT2-KO マウスを用いたマウス Concanavalin A (Con A) 肝炎モデルの解析

Con A をマウスに投与することによりヒトのウイルス性肝炎、自己免疫性肝炎に似た症状を示すことが知られている。最近、同肝炎モデルで肝臓 NKT 細胞重要な働きをしていることが報告されている。そこで LECT2 欠損マウス (LECT2-KO マウス) を用い同モデルの解析をおこなった。C57BL/6 (B6) マウス、同背景の LECT2-KO マウスに 25 mg/kg Con A を尾静脈内投与、肝障害の指標として血中 GPT の活性と肝臓の DNA 断片化を調べた。処理 5 時間後に、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、組織染色において肝細胞のアポトーシスをはじめとする肝細胞の変性が観察されより重篤になることが明らかとなった。各種サイトカインの血清中のレベルを ELISA 法で測定し、肝臓における遺伝子発現を半定量的 RT-PCR 法により検討した。その結果、NKT 細胞の産生する IL-4 が LECT2-KO マウスにおいて処理後 1 時間という極めて初期に発現量の倍増が見られた。肝臓での発現同様、血中サイトカイン量においても TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-10 では差が見られなかったが、IL-4 は処理後 1 時間で 2 倍の差が見られた。NKT 細胞は自らから産生した IL-4 により活性化し、FasL を発現し細胞障害性活性が上昇しアポトーシスに陥ることが知られているが、フローサイトメトリーによる解析により 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 細胞の割合が増えていることが明らか

となり、肝臓 NKT 細胞の増加により LECT2-KO マウスでは Con A 肝炎に感受性になったものと考えられた。

D. 考察

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。NKT 細胞は、近年その機能が明らかとなってきたおり、T 細胞抗原レセプターと NK 細胞の標識分子を発現するリンパ球であり、特に CD1d 依存的に α -GalCer により活性化される NKT 細胞について詳しく研究されている。また、獲得免疫と自然免疫の橋渡しをするリンパ球であることが明らかとなり、腫瘍免疫、自己免疫、感染免疫、免疫寛容等の広い領域で重要な働きをしていることが判ってきている。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。今後 NKT 細胞の関与する様々な生体反応に LECT2 が関わる可能性がある。

E. 結論

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関わり抑制的に働いている可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ito-ishida, M., Nagata, K., Oda, Y., 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.* (2003) 27,272-8.

2. 学会発表

- 1) Dawson, W., Ito-Ishida, M., Kameoka, Y., Yamagoe, S., Fukamura, Y., Yamamoto, K., Tanokura, M., Suzuki, K. : Structural determination of the LECT2 protein by combined experimental and computational strategies 第 26 回日本分子生物学会、神戸、2003 年 12 月
- 2) 山越 智、齊藤 武、奥村彰規、渡部久実、浅野雅秀、安保 徹、岩倉洋一郎、鈴木和男 : Concanavalin A 肝障害モデルを用いたサイトカイン LECT2 の機能解析 第 33 回日本免疫学会、福岡、2003 年 12 月
- 3) 奥村彰規、齊藤武、大谷功、大川原明子、浅野雅秀、岩倉洋一郎、鈴木和男、山越智 : 関節炎モデルを用いた LECT2 の役割解析第 33 回日本免疫学会、福岡、2003 年 12 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

分担研究者 亀岡洋祐 国立感染症研究所 主任研究官

研究要旨

ミエロペルオキシダーゼ（MPO）は抗好中球抗体（誘導）血管炎（MPO-ANCA）発症のトリガーとなる分子と考えられ、MPOの日本人集団における変異の頻度を明らかにすることは、MPO-ANCA関連血管炎治療方策を考案する際の基礎的データとして重要である。今年度はマロリーワイス症候群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。これまで解析されたMPO欠損例がエクソン9上であったのに対して、この症例ではエクソン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。日本人集団内でMPO欠損症の原因となる変異としてエクソン4上にThr175Alaを位置づけた。

A. 研究目的

抗好中球抗体誘導性血管炎は炎症性疾患において局部炎症に中心的な役割を果たす好中球から放出されるMPOは、局所炎症において多量に放出されハライドイオンの生成によって殺菌・殺ウイルス作用の中心的な役割を担っている。このMPOは生体細胞にとっても毒性があり、炎症局所においては好中球が放出したMPOによって組織が傷害される場合がある。組織に対して障害性の強いMPOに対して生体内では抗MPO抗体が生成され、この抗MPO抗体によって、局所炎症反応はカスケードを起し炎症増強が起こるものと考えられる。自己の分子であるMPOに対する抗体は通常は生成されないが、MPOの遺伝子変異がこの免疫寛容のバランスを崩し自己抗体形成にかかわっている可能性が考えられること

から、日本人集団におけるMPO遺伝子の変異頻度を測定するとともに、変異種を同定し、全身性炎症への性臨床対応に寄与するための基礎データを提供することを目的とした。今年度は新たに見出されたMPO完全欠損患者の解析によりMPO欠損の原因となる遺伝子部位を特定した。

B. 研究方法

マロリーワイス症候群患者にミエロペルオキシダーゼ（MPO）完全欠損症を見出した。ADVIAによるヘマトグラム解析ではTypeIの完全欠損を示した。この患者末梢血より好中球、及び単核球を分離し、好中球においてはMPO活性測定、O₂-産生億低を行い、単核球からは、mRNA、およびゲノムDNAを分離し、遺伝子発現解析、およびゲノムコード領域の解析を行った。好中球画分に

については、western-blot により MPO タンパクの解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究を遂行するためのサンプル収集についてはインフォームドコンセントのもとに行われ、MPO 欠損患者サンプル以外の頻度推定用サンプルについては、データ非連結として行われた。したがってサンプル提供者とデータは個々に結びつけることが不可能となっており、提供者の個人情報 は完全に保護される。MPO 欠損症患者についてもインフォームドコンセントの元にサンプル提供を依頼し、患者発見臨床医のみが個人情報との連結が可能で、遺伝子情報解析研究者は個人情報を知ることはできない。患者の個人情報保護は適正に行われている。

C. 研究結果

本症例患者のヘマトグラム解析結果では MPO 完全欠損である TypeI を示しており (図 1)、好中球画分の MPO 活性測定においてもほとんど活性が検出できず、完全欠損であることを確認した (図 1)。これに対して、O₂-産生能は健常者よりもやや高い値が検出された。

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 が検出されず、light subunit はまったく検出できず、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 (図 2)。

単核球画分から得た mRNA より MPO mRNA を 6 個のフラグメントに分け RT-PCR により検出したが、いずれも正常なサイズを示し、RNA 転写は正常に行われていることが示唆された (図 3)。得られた cDNA フラグメントの塩基配列解析を行ったと

ろ 3 個の点突然変異 (A465G、A523G、C1338T) を見出した。このうち A523G の変異はアミノ酸置換 (Thr175Ala) を伴うミスセンス変異であった (図 4)。本患者で見出された変異を mRNA およびペプチド上の位置を図 5 に示した。この 3 個の点突然変異について患者ゲノム DNA のコード領域を解析したところ、いずれの変異もホモであることが確認された。

D. 考察

MPO 欠損症を引き起こす点突然変異は Y173C、M251T、R569W が世界的には、知られている。日本人における MPO 欠損症の変異はこのいずれとも異なり、日本人集団に特異的な変異が原因となっていることを示し、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。

MPO 遺伝子はバイアレリックに転写されており (不完全欠損症患者解析により確認)、日本人 MPO 完全欠損症の発症は低い確率の変異がホモ接合体となることによって起きていた。今回同定された変異 Thr175Ala においてもホモ接合体であることを確認し、この変異が MPO 完全欠損の原因となっていることを明らかにした。

Western-blot による解析結果から正常サイズの重鎖ペプチドは検出されず、サイズの小さいペプチドが検出されていること、軽鎖ペプチドがまったく検出されないこと、合わせて Thr175Ala 変異の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。コーカソイドにおいても MPO 欠

損症例において Deleo らにより Tyr173Cys の変異が報告されており、Thr175Ala と位置が近いことから、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

日本人集団での MPO 遺伝子変異頻度の解析では Gly501Ser、Arg499Cys の MPO 機能欠損を引き起こす変異頻度は低いと考えられたが、エキソン 9 のほかに今回エキソン 4 に変異を検出したことから、この部位についての日本人の変異頻度の測定も重要な課題であるが、今後の課題として残されている。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。

E. 結論

日本人集団における MPO 分子機能に重要な影響を与えるエキソン 9 の変異頻度は 7/1000 であることを昨年度推定したが、今年度新たにエキソン 4 の MPO 完全欠損にかかわる変異を見出したことから、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。

F. 健康危険情報

MPO 欠損症に関してはノックアウトマウスの実験からカンジダ症等の真菌感染において持続感染を起こす危険性がある。MPO 欠損症の臨床例からは不明熱、および肺疾患との関連性が疑われ真菌感染と密接に関与していることが考えられる。全身性血管炎について患者の MPO 遺伝子変異についての情報を得ることは、その治療対応を決定する上での重要な因子であると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ohashi YY, Kameoka Y, Persad AS, Koi F, Yamagoe S, Hashimoto K, Suzuki K. Novel missense mutation found in a Japanese patient with myeloperoxidase deficiency. *Gene*. 2004 Mar 3;327(2):195-200.

Takahashi-Omoe H, Omoe K, Sakaguchi M, Kameoka Y, Matsushita S, Inada T. Analysis of protein expression by mammalian cell lines stably expressing lactate dehydrogenase-elevating virus ORF 5 and ORF 6 proteins. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2004 Mar;27(2):81-92.

Takahashi-Omoe H, Omoe K, Sakaguchi M, Kameoka Y, Matsushita S, Inada T. Production of virus-specific antiserum corresponding to sequences in the lactate dehydrogenase-elevating virus (LDV) ORF6 protein. *Comp Immunol Microbiol*

Infect Dis. 2004 Jan;27(1):47-55

Kuzmin IV, Orciari LA, Arai YT, Smith JS, Hanlon CA, Kameoka Y, Rupprecht CE. Bat lyssaviruses (Aravan and Khujand) from Central Asia: phylogenetic relationships according to N, P and G gene sequences Virus Res. 2003 Nov;97(2):65-79.

Hanyuda M, Kasama T, Isozaki T, Matsunawa MM, Yajima N, Miyaoka H, Uchida H, Kameoka Y, Ide H, Adachi M. Activated leucocytes express and secrete macrophage inflammatory protein-1alpha upon interaction with synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis via a beta2-integrin/ICAM-1 mechanism. Rheumatology (Oxford). 2003 Nov;42(11):1390-7. Epub 2003 Jun 27.

Ichimori K, Fukuyama N, Nakazawa H, Aratani Y, Koyama H, Takizawa S, Kameoka Y, Ishida-Okawara A, Kohi F, Suzuki K. Myeloperoxidase has directly-opposed effects on nitration reaction--study on myeloperoxidase-deficient patient and myeloperoxidase-knockout mice. Free Radic Res. 2003 May;37(5):481-9.

Arai T.Y, Kuzmin V.I, Kameoka Y, Botvinkin D. A. Identification of a new lyssavirus genotype from the lesser mouse-eared bat (Myotis blythi) in

Kyrgyzstan. Emerging Infectious Diseases, 2003 Mar 9;3:333-336.

Hiromu Sugiyama, Yasuyuki Morishima, Kyoko Sakamoto, Yosuke Kameoka, and Masanori Kawanaka. Raccoon Roundworm, Baylisascaris procyonis, as a cause of larva migrans. Jpn. J. Vet. Parasitol. Vol.2. 2003

2. 学会発表

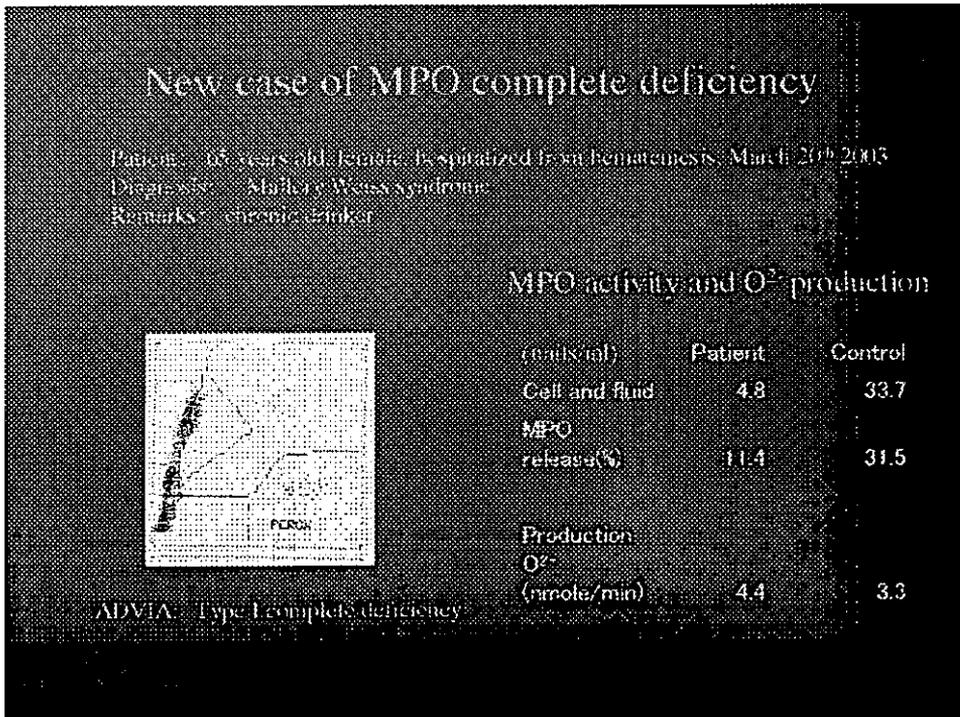
Dawson Wayne, Ishida Mie, Kameoka Yosuke, Yamagoe Satoshi, Futamura Yasuhiro, Yamamoto Kenji, Tanokura Masaru, Suzuki Kazuo. Structural determination of the LECT2 protein by combined experimental and computational strategies、第26日本分子生物学会総会、神戸、平成15年12月

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総会、神戸、平成15年12月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

☒ 1



☒ 2

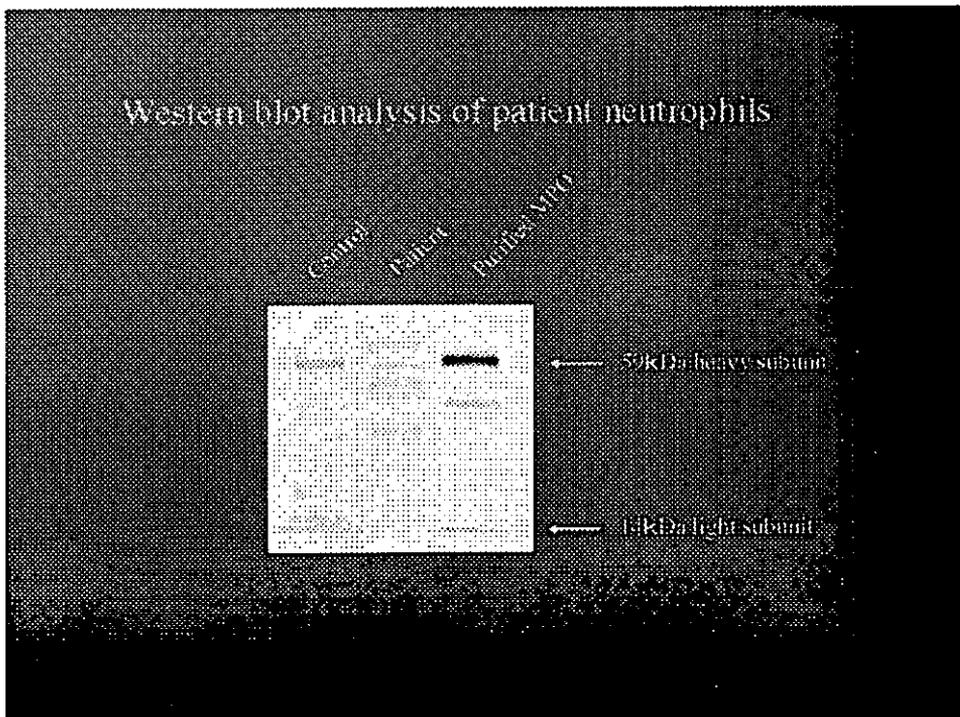


图 3

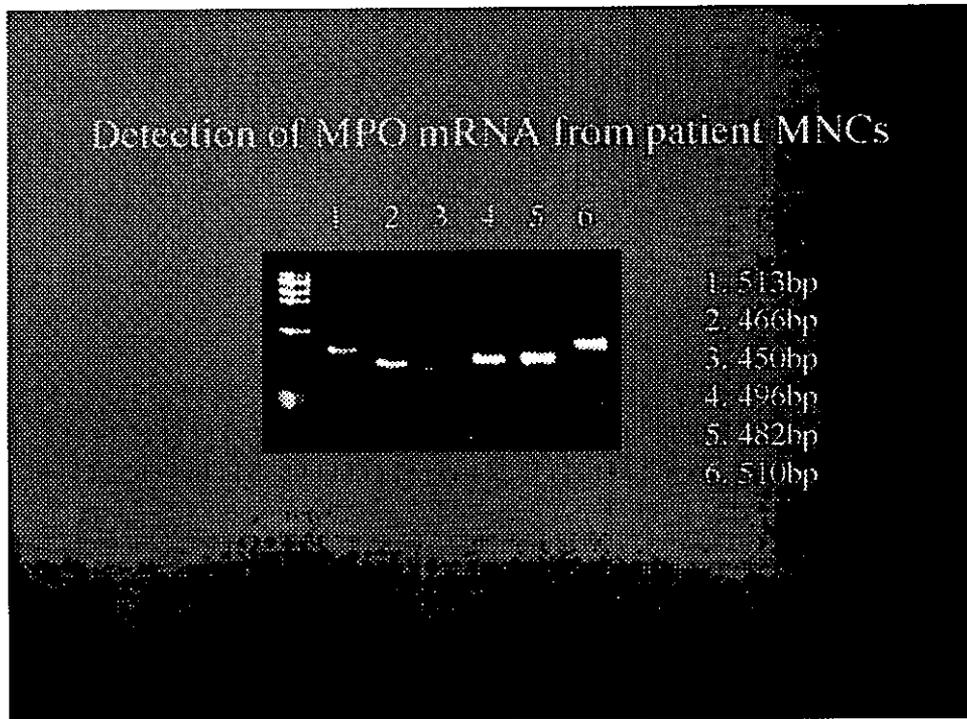


图 4

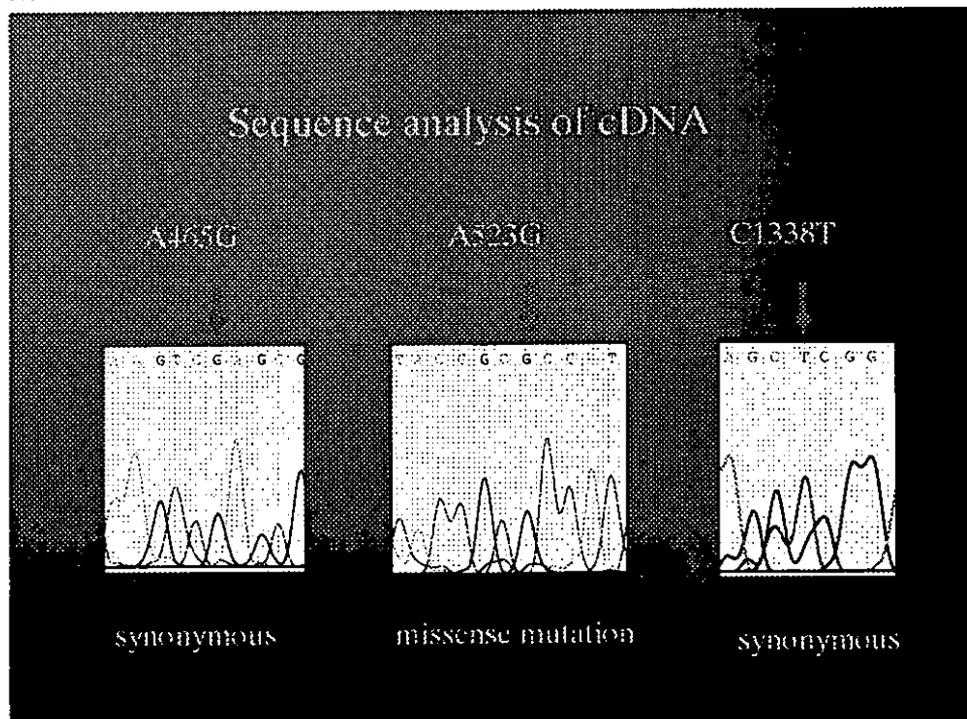
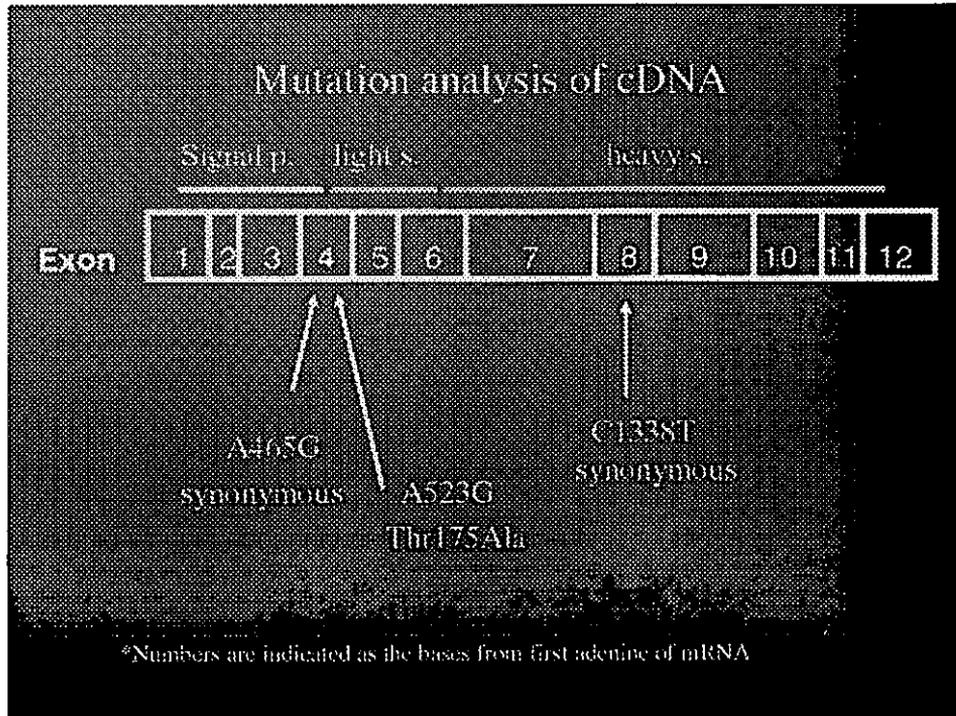


图 5



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

分担研究者 武曾恵理 （財）田附興風会医学研究所北野病院腎臓内科部長
協力研究者 猪原登志子 京都大学大学院医学研究科循環病態学講座
小野孝彦 京都大学大学院医学研究科循環病態学講座
深津敦司 京都大学大学院医学研究科循環病態学講座

研究要旨

難治性血管炎を来して、多臓器の障害をもたらし、しばしば生命予後を脅かす ANCA 関連腎炎血管炎は、近年その発症頻度がまし、社会的問題となっている。とくに高齢者に多発する事が特徴でその治療には強力な免疫抑制剤を投与するためその副作用による臓器障害も深刻である。その発症および進展機序には、活性化好中球が関与し、これから放出される活性酸素が組織障害性に働くがその後の病態進行には、TNF α をはじめ、数々の炎症性サイトカインの関与が示唆されている。本研究では多臓器に発症した血管炎の為死亡した 57 歳男性症例の病態解析を報告すると共に、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を解析し、その病態進展機序の考察を試みた。

A. 研究目的

多臓器を巻き込んで重症化する ANCA 関連血管炎症候群の治療には強力な免疫抑制療法が必要であるが、高齢者に多く、治療の副作用による感染症もまた、多臓器不全 (MOF) の原因となり致命的な転帰をたどることもしばしば経験される。これらの代表である ANCA 関連血管炎症候群の多臓器障害剖検例の解析を行った。また 15 症例の多臓器障害と血中サイトカインの動向を検討することで、多臓器不全に至る病態を考察した。

B. 研究方法（倫理面への配慮）

1) ANCA 関連腎炎、血管炎により死亡した症例の剖検を通して、その多臓器障害を

検討した。剖検は家族および親族の文書による同意を得て行った。

2) MPO-ANCA 関連腎炎・血管炎患者 15 名。治療開始前の臨床的治療効果判定を Birmingham vasculitis activity score (BVAS)⁽¹⁾、血中 WBC、血清 CRP、Cre、MPO-ANCA で評価した。うち 12 例 (Patient 1-2, 4-13) においては血中サイトカインの変化を測定、健常者 12 例の値と比較した。Tumor necrosis factor- α (TNF- α)、Interleukin-1 β (IL-1 β)、Macrophage chemoattractant protein (MCP-1)、Interleukin-4 (IL-4)、Interleukin-6 (IL-6)、Interleukin-8 (IL-8)、Interleukin-10 (IL-10)、Interferon- γ (IFN- γ)、Interleukin-12 (IL-12)、Interleukin-18

(IL-18) を測定した。IL-18、MCP-1、IFN- γ 測定は Biosource International (California, USA) 社の Sandwich Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) kit を用い、TNF- α 、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12 については UltraSensitive ELISA kit を用い、使用した。IL-18 は MBL (Nagoya, Japan) 社の Human IL-18 ELISA kit を使用した。

全例において、検体採取、評価における informed consent を得た。

C. 研究結果

症例報告：57 歳男性

【主訴】全身倦怠感

【既往歴】26 歳：顔面神経麻痺

【家族歴】姉：乳癌，兄：気管支喘息。

【現病歴】2000 年より肺線維症の診断にて他院呼吸器内科に通院。2001 年 5 月、MPO-ANCA 240 EU と高値を指摘されるが、尿所見なく Cre 0.8mg/dl と腎機能も正常であったため、経過観察された。2002 年 4 月、尿蛋白(1+)、潜血(3+)を指摘される。2002 年 7 月末、多発性関節痛と全身倦怠感が出現。鎮痛剤で関節症状は軽快するも、全身倦怠感と食欲不振が持続するため、2002 年 8 月 6 日通院先の病院を受診したところ、Cre 2.7mg/dl, BUN 35mg/dl, WBC 12,700 /ul, CRP 14.6 mg/dl と腎機能低下、高度の炎症反応を指摘され、北野病院腎臓内科を紹介され 2002 年 8 月 8 日入院となる。

【入院時現症】身長 167.4 cm, 体重 68.0 kg. 体温 36.1 °C, 脈拍 78/ 整, 血圧 148/74. 両上強膜炎を認める。両下肺野に fine crackle を聴取。

【入院時検査所見】尿潜血 (3+), 尿蛋白 (2+). WBC 12,500/ul, Hb 10.3g/dl, Ht 32.8%, Plt 36.8×10^3 /ul, CRP 14.74 mg/dl, TP 6.8g/dl, Alb 3.3g/dl, BUN 39.7mg/dl, Cre 2.96 mg/dl, UA 6.9mg/dl, MPO-ANCA 980EU. 腎エコー：右腎長径 103.5 mm, 左腎長径 110.1 mm.

【入院後経過】入院後 8 月 13 日腎生検を施行したところ、Necrotizing lesion 3 箇所を含む Active crescent 63.6%と Arteriolitis を認め、Necrotizing crescentic glomerulonephritis/Microscopic polyangiitis (CrGN/MPA) と診断。MPO-ANCA 980EU と高値であり、MPO-ANCA 関連腎炎・血管炎による急速進行性糸球体腎炎(RPGN)と診断した。腎生検終了後よりIVIg療法を5日間行ったあと、8月23日よりプレドニン(PSL) 45mg、ヘパリン療法を開始した。入院時 14mg/dl であった CRP は陰性化し、Cre も 4.04mg/dl から徐々に低下した。9月14日から10月1日からそれぞれ3日間メチルプレドニゾンミニバルス療法を行ったところ、10月4日十二指腸潰瘍からの動脈性出血による下血を認め、ヘパリンを中止、PSL 減量、サイクロフォスファミド(CYC 100mg/日)を追加した。全身状態、尿所見の改善を認め、Cre 1.6-1.8mg/dl 前後で安定したため、11月8日退院となった。外来経過観察中全身状態は安定していたが、12月初めより感冒症状があり、抗生剤 (CFPN-PI) を処方された。感冒症状は軽快したが、外陰部に掻痒を伴う皮疹が出現し、全身へ拡大したため12月16日再入院となった。皮疹は薬疹と判断し、薬剤の中止と対症療法を行ったが増悪、顔面浮腫まで出現してきたため、

12月19日よりメチルプレドニゾンミニパルス療法を行った。これにより皮疹は改善したが、入院翌日の胸部XP上認められた両側浸潤影は変化なく、肺炎を疑いMEPM, GFLXを開始したところ、12月24日WBC 600/ μ l, 無顆粒球症を認めた。骨髓穿刺でも顆粒球系成熟過程の血球を認めず、薬剤性無顆粒球症の所見と一致した。G-CSF投与を行いながら、別の抗生剤(ISP, CLDM, MINO)で治療を継続したが、肺浸潤影は軽快しなかった。複数回の痰培養が陰性であり、間質性肺炎の急性増悪の可能性も考えられたため12月26日よりメチルプレドニゾンパルス療法を行い、27日より人工呼吸管理とした。血中サイトメガロウイルス(CMV)陽性結果が判明したため、27日よりガンシクロビル点滴も開始したが、呼吸状態の改善は認められなかった。1月5日頃より尿量増加と血中Na上昇が出現し、中枢性尿崩症を疑い頭部CTを撮影したところ、小脳性出血、くも膜下出血、水頭症を認めた。平坦脳波であり、1月9日永眠された(Figure1)。剖検では小脳、肺、消化管の血管炎を認め、全身性血管炎と診断された。

2) サイトカイン測定による病態の解析

15例の患者の背景を示す(Table1)。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。MPO-ANCA値は平均 389 ± 115 EUであった。15例のうち、4例が腎限局型、11例が腎外症状を呈する多臓器障害型であった。腎生検における組織学的所見はMicroscopic

polyangiitis (MPA) 12例、Crescentic glomerulonephritis (CrGN)のみが3例であった。細胞性半月体と細胞線維性半月体の両者をあわせた活動性半月体形成率は $55.1\pm 7.5\%$ であった。

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(Figure 2a, 2b, 2d)。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た(Figure 2c)。また、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(Figure 2e, 2f)。血漿IFN- γ は血管炎患者と健常者で有意差を認めなかった(Figure 2g)。血清IL-18, MCP-1, IL-4は健常者と有意差を認めなかった。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(Figure 3a)。各サイトカインの動向は、多臓器障害群で高値を示す例もあったが有意の差には至っていない。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(Figure 3b)。

D. 考察

MPO-ANCA関連血管炎患者12例において、治療開始前の血中サイトカインを測定したところ、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。

ANCA 関連血管炎症候群の病態には好中球が中心的な役割を示している。感染などの刺激が加わることにより、モノサイトからの TNF- α などのサイトカイン放出が引き起こされ、好中球をプライミングした状態におく。プライミングされた好中球はその細胞表面上に MPO を発現し、また流血中にも MPO を放出する。これが抗原刺激となり、MPO-ANCA が産生される。MPO と MPO-ANCA の存在下で、二次的な感染刺激などが加わることにより、プライミングされている好中球が活性化され、血管内皮と結合した活性化好中球からさらなる MPO の脱顆粒や活性酸素が産生され、血管内皮障害を起こすことが示されてきている^(2,3)。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、マクロファージにより貪食されるが、このことがマクロファージからの向炎症性サイトカイン放出のトリガーとなり、慢性炎症が引き起こされることが報告されている⁽⁴⁾。さらにいくつかのサイトカインが血管炎の疾患活動性との相関が報告されており、IL-6 と WG の疾患活動性との相関⁽⁵⁾や、PR-ANCA と TNF- α との相互作用によりプライムされた単核球がモノサイト細胞表面上に発現された Fc γ R と PR3 との cross-linking により IL-8 産生を刺激することなどが報告されている⁽⁶⁾。今回の我々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糸球体と半月体における IL-8 を証明している⁽⁷⁾ 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。ANCA 関連血管炎症候群の病態仮説を Figure 4 (参考文献 8 より改変) に示す。

MPO-ANCA 関連血管炎症候群において血尿蛋白尿などの腎症状はほぼ必発であり、初発症状にもなりうるが、しばしば急速に腎機能の低下する急速進行性糸球体腎炎を呈する。生命予後に大きな影響を与える要因としては年齢、治療開始時の腎機能、肺病変の有無であると報告されているが⁽⁹⁾、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る。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。今後、患者数を増やし、検討を重ねる必要があると考えられた。

E. 結論

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。

F. 健康危機情報

なし

参考文献

- 1) Luqmani RA, Bacon PA, Moots RJ, et al. Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS) in systemic necrotizing vasculitis.