

な疾患感受性因子であることが確認された。しかし、このハプロタイプと extended haplotype を形成する対立遺伝子のうちで、DPB1*0201, C*0303, B*15111 の増加傾向が観察され、うち、遺伝子頻度は低いものの、B*15111 の MPA における有意な上昇が観察された。また、DRB1*0901-DQB1*0303-DPB1*0201 ハプロタイプのオッズ比は、DRB1*0901, DQB1*0303 単独より高い傾向が認められた。以上の結果から、MPA 疾患感受性における HLA 領域遺伝子の寄与は主として DR-DQ 領域によって説明しうるものの、ほかの HLA 領域遺伝子座の寄与も存在する可能性が示唆された。

KIR 遺伝子群の検討では、活性化型である KIR2DS1 遺伝子を有する頻度が MPA において低い傾向が認められた。次に、HLA リガンドと KIR 遺伝子の組み合わせについて検討したところ、HLA-Bw4 エピトープとそれに対応する抑制型の KIR 3DL1 が陽性かつ活性化型の KIR 3DS1 が陰性の群が MPA に多い傾向が認められた。以上の結果は、HLA 分子からの抑制シグナルが KIR を介して伝達される一方で活性化シグナルが減弱することが、例えばウイルス感染に対する抵抗性の減弱を介して疾患感受性に関わる可能性を示唆し、今後、症例数を増やした検討が必要と考えられた。統計学的有意差には到達しなかったものの、MPA では、抑制型受容体 KIR3DL1 とそのリガンド HLA-Bw4 エピトープを持ち、活性

化型受容体 KIR3DS1 を持たない群が多い傾向が認められた ($P=0.059$ 、 χ^2 -test)。

3. 血管炎における抗内皮細胞抗体の対応抗原に関する検討

血管内皮細胞に特異性の高い自己抗原を、血管炎患者血清を用いた 2 次元電気泳動とウエスタンブロッティングの組み合わせで、網羅的に検出し、約 50 個の抗内皮細胞抗体対応抗原を検出した。

そのうちのひとつペロキシレドキシニン 2 に対する自己抗体は各種自己免疫疾患において、血管炎の存在と相関して検出されることが明らかとなった。

抗ペロキシレドキシニン 2 抗体価は血管炎の治療により、速やかに低下し、疾患のモニタリングにも有効であると考えられた。

抗ペロキシレドキシニン 2 抗体の存在は TAT、D-ダイマー高値と相関があり、病因論的に血栓形成と関連すると考えられた。

その他のペロキシレドキシニンであるペロキシレドキシニン 1 と 4 に対する自己抗体は存在するが、血管炎との有意な関連は認められなかった。

D. 考察

1. 血管炎発症に関する好中球 CD69 の解析

CD69-KO マウスによる *in vivo* での解析から、血管炎の発症頻度の低下と活性酸素誘導の血栓形成による血流遮断の遅

延の結果が得られた。このことは、血管炎発症初期において血小板凝集がおり、それによっておこる血管炎に CD69 分子が関与することが強く示唆された。また、血管炎発症初期の IL-12p70, IL-1_β および IL-10 が著明な増加が認められたことから、初期反応において、好中球の活性化とこれらサイトカインの変動が連動していることが示唆された。この活性化において、活性化好中球の表面に CD69 分子が移行することが重要と考えられた。以上の結果から、活性化好中球表面に出る CD69 分子が、炎症性サイトカインレベルの上昇と連動し、好中球の炎症反応とともに血栓形成に続いて、血管炎が進展することに CD69 分子の関与が強く示唆された。

2. 顕微鏡的多発血管炎における HLA および KIR 遺伝子群の関連の解析

HLA 領域における主要な疾患感受性因子として、DRB1*0901-DBB1*0303 ハプロタイプがであることが確認されたが、このハプロタイプと extended haplotype を形成する対立遺伝子のうちで、DPB1*0201, C*0303, B*15111 の増加傾向が観察され、うち、B*15111 の MPA における有意な上昇が関与していると推定される。また、DRB1*0901-DQB1*0303-DPB1*0201 ハプロタイプのオッズ比が、DRB1*0901, DQB1*0303 単独より高い傾向が認められたことから、MPA 疾患感受性における HLA 領域遺伝子の寄与は主

として DR-DQ 領域によって説明しうるものの、ほかの HLA 領域遺伝子座の寄与も存在する可能性が示唆された。

一方、活性化型 KIR 遺伝子群では、KIR2DS1 遺伝子を有する頻度が MPA において低い傾向がく、HLA リガンドと KIR 遺伝子の組み合わせの検討により、HLA-Bw4 エピトープとそれに対応する抑制型の KIR 3DL1 が陽性かつ活性化型の KIR 3DS1 が陰性の群が MPA に多い傾向が認められた。これらの結果から、HLA 分子からの抑制シグナルが KIR を介して伝達される一方で活性化シグナルが減弱することが示唆された。今後、症例数を増やした検討が必要と考えられた。

3. 血管炎における抗内皮細胞抗体の対応抗原に関する検討

血管内皮細胞に特異性の高い自己抗原を、網羅的に検出し、約 50 個の抗内皮細胞抗体対応抗原を検出し、そのうちのひとつペロキシレドキシニン 2 に対する自己抗体は各種自己免疫疾患において、血管炎の存在と相関して検出された。これらの結果から、抗ペロキシレドキシニン 2 抗体価は血管炎の治療評価などのモニタリングにも有効であると考えられた。また、抗ペロキシレドキシニン 2 抗体は病因論的に血栓形成と関連すると考えられた。

今後は、抗ペロキシレドキシニン 2 抗体の簡便かつ鋭敏な検出系を確立し、サンプル数を増やした大規模検定が必要である。さらに、既検出未同定の内皮細胞抗

原の同定を進める必要がある。

E. 結論

基礎研究分科会では、分科会員3名と協力研究者1名（鈴木和男、土屋尚之、加藤智啓、高橋啓）により施行し、過去2年間の成果に加え、平成16年度の実績を得た。血管炎発症に関する要因の解析では、新たに好中球 CD69 の関与が示された。また、顕微鏡的多発血管炎における HLA および KIR 遺伝子群の関与が提示された。さらに、血管炎における抗内皮細胞抗体の対応抗原として抗ペロキシレドキシニン2を新たに候補として提示した。

G. 研究発表

1. 論文発表

各分担者報告の項参照

2. 学会発表

各分担者報告の項参照

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

各分担者報告の項参照

2. 実用新案登録

各分担者報告の項参照

3. その他

各分担者報告の項参照

プロテオミクスを用いた抗内皮細胞抗体の対応抗原の網羅的同定と解析
分担研究者 加藤 智啓 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター助教授

研究要旨

難治性血管炎の病態に重要と考えられる抗内皮細胞抗体の対応抗原の同定を、プロテオミクスを用いて網羅的に行った。各種血管炎患者血清による differential western blotting 法で約 50 個の候補抗原スポットを検出した。その中のひとつは peroxiredoxin2 であり、実際に組換え蛋白を調整し、抗原性を確認した。ELISA法にて、血管炎を含む膠原病血清を検索した結果、本自己抗体は血管炎の存在に特異性の高いことが判明した。また、peroxiredoxin2 以外に peroxiredoxin1 および 2 を検索したが、血管炎に対する特異性は低かった。peroxiredoxin2 に対する自己抗体は診断的意義があると考えられ、今後、血管内皮細胞に対する同自己抗体の作用の検討する必要がある。

A. 研究目的

本研究は難治性血管炎の発症に重要と考えられる抗内皮細胞抗体の血管内皮細胞への結合とその影響を解明することを目的とする。結節性多発動脈炎など血管炎症を主体とする一群の疾患（いわゆる血管炎症候群）は、一般に難治性かつ予後不良であり、病因解明が社会的要請である。発症機序としては自己免疫機序の関与が考えられているが、その詳細は不明である。血管炎症候群で高頻度に検出される自己抗体には抗好中球細胞質抗体と抗内皮細胞抗体がある。前者においてはミエロペルオキシダーゼなど主要な対応抗原が同定され、現在その病因論的役割が研究されている。一方、抗内皮細胞抗体は血管内皮細胞に直接結合による障害を通して血管炎を発症する機序が考えられている。従って抗内皮細胞抗体の種類とそれによる内皮細胞障害の機序を解明すれば、血管炎の初期においてその進行を防ぐことができると考えられる。しかしながら、抗内皮細胞抗体の対応抗原が詳しく特定されてないために、抗内皮細胞抗体の血管内皮細胞への結合と障害機序を分子レベルで解明できないのが現状である。そのため、本研究においては抗内皮細胞抗体の標的抗原の網羅的同定を最初の目標とする

B. 研究方法

プロテオミクスを用いた differential western blotting 法で、血管内皮細胞に特異的な自己抗原を網羅的に検出解析する。具体的にはヒト臍帯静脈由来内皮細胞(HUVEC)と比較用細胞として Hela 細胞を用い、それぞれから尿素、チオ尿素、CHAPS を含む溶液で蛋白を抽出した。これを等電点電気泳動および分子量による SDS-PAGE を組み合わせた 2 次元電気泳動法で分離展開した。その後、ニトロセルロース膜に転写し、血管炎を有する全身性自己免疫疾患患者血清を用いてエ

ウスタンプロットを行った。血清に反応した蛋白スポット（自己抗原スポット）の蛋白を同定するために、同様に 2 次元電気泳動法で展開し、クマシー染色したゲルから、陽性蛋白スポットに一致するスポットを切り出して回収し、トリプシン消化後、ゲルから抽出した。これらの消化ペプチドの質量を、飛行時間型質量分析器を用いた mass-fingerprinting 法により決定し、マスコット（ソフトウェア）による蛋白データベース検索から質量の一致する候補蛋白を選定した。候補蛋白は、報告されている mRNA 配列から、PCR を用いて cDNA を増幅、クローニングし、マルトース結合蛋白 (MBP) との融合蛋白として大腸菌で発現させ、精製した。これを用いて抗原性の確認とともに、エウスタンプロット法と ELISA 法にて血管炎を有する全身性自己免疫疾患患者、血管炎を有しない全身性自己免疫疾患患者、および健常人の血清を広く検索した。

C. 研究結果

HUVEC および Hela 細胞のプロテオームを用いた Differential Western Blotting 法を行い、Wegener 肉芽腫症、Henöch-Schönlien 紫斑、血管型ベーチェット病、結節性多発動脈炎、悪性関節リウマチなどの患者血清を用いて約 50 個の HUVEC に特異性の高い自己抗原を検出した。mass-fingerprinting 法にて同定した候補蛋白の中に peroxiredoxin2 があり、これについて組換え蛋白を作成し、ELISA 法にて、血管炎を含む多数膠原病血清を検索した結果、本自己抗体は血管炎患者の 60% 以上で検出されるが、血管炎を有しない場合は 10% 程度であることが判明し、血管炎の存在に特異性の高いことが判明した。

D. 考察

細胞腫あるいは組織特異的に発現する自己抗原を同定するために、本研究で用いた 2 次元電気泳動後と Differential Western Blotting 法の組み合

わせは極めて有効であった。peroxiredoxin2 は酸化作用をもつ酵素で、細胞表面にも検出される。これに対する自己抗体が存在することは、血管炎において、血管内皮細胞が酸化に対する抵抗性が現弱し、傷害が進む因子になりうると考えられた。

E. 結論

プロテオミクス手法を用いて、抗内皮細胞抗体の標的抗原を網羅的に解析することができると考えられた。抗内皮細胞抗体は対応抗原の種類によってあるいはその組み合わせによって、内皮細胞への影響が異なることは容易に想像される。今後 peroxiredoxin2 を含め、個別的解析により、抗原別および組み合わせによる内皮細胞障害の機序の解明を行っていく必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Guo-Hua Yuan, Atsuyuki Shibakawa, Michiaki Tanaka, Kayo Masuko-Hongo, Tomohiro Kato, Kusuki Nishioka, Hiroshi Nakamura. Characterization of Cells from Pannus-like Tissue over Articular Cartilage of Advanced Osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2004 Jan; 12(1):38-45.
2. Yao Z, Kurokawa MS, Masuko-hongo K, Tsuruha J, Sakata M, Nakamura H, Nishioka K, Kato T. Characterization of arthropathy in mice immunized with cartilage intermediate layer protein. *Ann Rheum Dis*. 2004 Mar; 63(3):252-8.
3. Takata S, Nakamura H, Umemoto S, Yamaguchi K, Sekine T, Kato T, Nishioka K, Matsuzaki M. Identification of autoantibodies with the corresponding antigen for repetitive coxsackievirus infection-induced cardiomyopathy. *Circ J*. 2004 Jul; 68(7):677-82.
4. Xiang Y, Sekine T, Nakamura H, Ohmi S, Fukuda H, Nishioka K, Kato T. Proteomic surveillance of autoimmunity in osteoarthritis: Identification of triose phosphate isomerase as an autoantigen in patients with osteoarthritis. *Arthritis & Rheum* 2004; 50:1511-1521.
5. Tazzari PL, Bonifazi F, Bandini G, Kato T, Conte R, Ferrara GB, Pistillo MP. ATG/AMG immunosuppressive effect in mediated by anti-CTLA-4 antibodies.: In HLA2003 by International Hostpcompatibility Working Group. (in press)
6. Nakamura M, Tsutsumi, Sekine T, Koizuka, Nishioka K, Kato T. Identification of β -tubulin isoform as an autoantigen in allergic rhinitis. *Microbiol. Immunol*. 2004; 48:427-434.
7. Kato T, Asahara H, Suzuki-Kurokawa M, Fujisawa K, Hasunuma T, Inoue H, Motokawa S, Sumida T, Nishioka K. HTLV-I env protein acts as a major antigen in patients with HTLV-I associated arthropathy. *Clin Rheumatol* 2004 Oct; 23(5):400-9.
8. Tanaka M, Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K, Nakamura H. Suppressive effects of hyaluronan on MMP-1 and RANTES production from chondrocytes. *Rheumatol Int*. 2004 Dec 3 (in press)
9. Kato T, Xiang Y, Nakamura H, Nishioka K. Neo-antigens in oateoarthritis. *Curr Opinion Rheumatol* 2004; 16:604-608.
10. Nakamura H, Shibakawa A, Tanaka M, Kato T, Nishioka K. Effects of glucosamine hydrochloride on the production of prostaglandin E2, nitric oxide and metalloproteases by chondrocytes and synoviocytes in osteoarthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2004; 22:293-299.
11. Hui D, Masuko-Hongo K, Xiang Y, Boa CD, Wang XD, Chen SL, Kato T, Nishioka K. Prevalence of autoantibodies against cartilage intermediate layer protein, YKL39, osteopontin, and cyclic citrullinated peptide in patients with early-stage knee osteoarthritis: Evidence for a variety of autoimmune processes in OA patients *Rheumatol Int*. (in press)
12. Shan ZZ, Masuko-Hongo K, Dai SM, Nakamura H, Kato T, Noshioka K. A role of 15d-PGJ2 in chondrocyte apoptosis. *JBC* 2004; 279:37939-37950.
13. Fukuda Y, Yotsuyanagi H, Sekine T, Suzuki M, Itoh F, Nishioka K, Kato T. Identification of new autoantibody in patients with chronic hepatitis. *Human Immunol*. (in press)
14. Karasawa R, Ozaki S, Nishioka K, Kato T. Autoantibodies to Peroxiredoxin I and IV in patients with systemic autoimmune diseases. *Microbiol Immunol*. (in press)
15. Masuko-Hongo K, Kato T. Recent developements in treatment of osteoarthritis. *Current Drug Inflammation and Allergy* (in press).
16. Matsuoka A, Kato T, Soma Y, Takahama H, Nakamura M, Matsuoka H, Mizoguchi M Analysis of T cell receptor (TCR) BV-gene clonotypes in NC/Nga mice developing dermatitis resembling human atopic dermatitis. *J. Dermatol. Sci*. (in press)
17. Orita M, Masuko-Hongo K, Yotsuyanagi H, Matsui T, Suzuki-Kurokawa M, Nishioka K, Kato T. Molecular Transplantation: Delivery of membranous proteins onto live cells. *Analytical Biochem* (in press)

2. 学会発表

1. 中村洋、田中道明、加藤智啓、西岡久寿樹: Hyaluronateの軟骨細胞のMMP-1抑制作用とそのメカニズム, 第3回 Biomatrix Forum 研究発表会 パレスホテル(東京) 1/17, 2004
2. 加藤智啓: リウマチ性疾患のプロテオミクス, ハイテク・リサーチ・センターフォーラム 2004 聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター 1/20, 2004
3. 唐澤里江、関根太一、大岡正道、三井健一、貫名信行、西村裕之、尾崎承一、西岡久寿樹、加藤智啓: 血管炎における抗内皮細胞抗体の対応抗原に関する検討: ペルオキシレドキシニン2に対する自己抗体. 平成15年度第2回 厚生労働科学研究費補助金班会議 難治性疾患克服研究事業「難治性血管炎に関する調査研究」都市センターホテル(東京) 2/13, 2004

4. 増子佳世、加藤智啓:酸化ストレスによる蛋白抗原性の変化について:プロテオミクスによる包括的解析. 平成15年度班会議 厚生労働省難治性疾患克服研究事業「自己免疫疾患に関する調査研究」札幌市教育文化会館(北海道) 3/5-6, 2004
5. 加藤智啓:SART mouse: Novel animal model of FMS. 線維筋痛症国際公開シンポジウム(International Symposium of Fibromyalgia) 都市センターホテル(東京) 3/22, 2004
6. 松尾光祐、中村洋、野寄浩司、斎藤知行、西岡久寿樹、加藤智啓:関節リウマチおよび変形性関節症における滑膜細胞のプロテオーム解析. 第48回日本リウマチ学会総会・学術集会 岡山コンベンションセンター/ホテルグランヴィア岡山(岡山) 4/15-17, 2004
7. 中村洋、加藤智啓、増子佳世、遊道和雄、西岡久寿樹:軟骨細胞のMMP、chemokine産生およびapoptosisに対するCelecoxibの影響. 第48回日本リウマチ学会総会・学術集会 岡山コンベンションセンター/ホテルグランヴィア岡山(岡山) 4/15-17, 2004
8. 高田智子、中村浩士、松崎益徳、加藤智啓、西岡久寿樹:ウイルス性心筋炎再感染モデルにおける心筋自己抗原の同定. 第48回日本リウマチ学会総会・学術集会 岡山コンベンションセンター/ホテルグランヴィア岡山(岡山) 4/15-17, 2004
9. 加藤智啓、中村洋、山田秀裕、尾崎承一、西岡久寿樹:関節リウマチにおけるプロテオーム診断の可能性. 第48回日本リウマチ学会総会・学術集会 岡山コンベンションセンター/ホテルグランヴィア岡山(岡山) 4/15-17, 2004
10. 中村洋、加藤智啓、田中道明、増子佳世、遊道和雄、西岡久寿樹:高分子ヒアルロン酸の軟骨細胞MAPKシグナル伝達に対する作用. 第48回日本リウマチ学会総会・学術集会 岡山コンベンションセンター/ホテルグランヴィア岡山(岡山) 4/15-17, 2004
11. 唐澤里江、関根太一、大岡正道、西村裕之、尾崎承一、西岡久寿樹、加藤智啓:血管炎における抗内皮細胞抗体の対応抗原に対する検討. 第48回日本リウマチ学会総会・学術集会 岡山コンベンションセンター/ホテルグランヴィア岡山(岡山) 4/15-17, 2004
12. Shan ZZ、増子佳世、中村洋、加藤智啓、西岡久寿樹: A potential role of 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 in apoptosis of human articular chondrocytes. 第48回日本リウマチ学会総会・学術集会 岡山(岡山コンベンションセンター/ホテルグランヴィア岡山) 4/15-17, 2004
13. Xiang Y, Sekine T, Nakamura H, Nishioka K, Kato T.: Fibulin-4 is a component of cartilage and a target of autoantibodies in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. 第48回日本リウマチ学会総会・学術集会 岡山コンベンションセンター/ホテルグランヴィア岡山(岡山) 4/15-17, 2004
14. 芝川温之、西岡久寿樹、増子佳世、加藤智啓、遊道和雄、中村洋:変形性関節症における軟骨下骨髄組織による軟骨破壊機構. 第48回日本リウマチ学会総会・学術集会 岡山コンベンションセンター/ホテルグランヴィア岡山(岡山) 4/15-17, 2004
15. Kato T, Karasawa R, Ooka S, Sekine T, Nishimura H, Nukina N, Mitsui K, Ozaki S, Nishioka K.: Comprehensive analysis of targets of anti-endothelial cell antibodies. 第2回日本ヒトプロテオーム学会(Japan Human Proteomics 2004 / The 2nd Annual Meeting of JHUPPO) 板橋区立文化会館 5/19-20, 2004
16. 加藤智啓:変形性関節症と自己免疫:プロテオミクスによるOAとRAの自己免疫プロファイルの探索. 第22回日本骨代謝学会 グランキューブ大阪 8/4-7, 2004
17. 加藤智啓:リウマチ性疾患におけるプロテオミクス(Proteomics in Rheumatic Diseases). 第3回リウマチ膠原病・よつやセミナー 主婦会館プラザエフ(東京) 9/4, 2004
18. Du H, Kato T, Xiang Y, Bao C-D, Wang X-D, Masuko-Hongo K, Nakamura H, Chen S-L, Nishioka K.: Prevalance of autoantibodies against cartilage intermediate layer protein (CILP), YKL-39, osteopontin, cyclic citrullinated peptide (CCP) in patients with knee osteoarthritis of early but not of advanced stage: an evidence for the presence of a variety of autoimmunity in OA patients. The 11th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress (APLAR) International Convention Center (ICC), Jeju, Korea 9/11-15, 2004
19. Nakamura H, Shibakawa A, Masuko-Hongo K, Yudoh K, Kato T, Beppu M, Nishioka K.: Reparative and destructive features of pannus-like soft tissue on articular cartilage of osteoarthritis. The 11th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress (APLAR) International Convention Center (ICC), Jeju, Korea 9/11-15, 2004
20. Yudoh K, Dai SM, Nakamura H, Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K.: Proinflammatory cytokine IL-18 stimulates T-cell mediated osteoclastogenesis through the Up-regulation of RANKL and soluble RANKL in T cells. The 11th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress (APLAR) International Convention Center (ICC), Jeju, Korea 9/11-15, 2004
21. Ozaki S, Karasawa R, Ooka S, Sekine T, Nishimura H, Mitsui K, Nukina N, Nishioka K, Kato T.: Peroxiredoxin 2: A novel autoantigen for anti-endothelial cell antibodies (AECA) identified by proteomic surveillance.. The 11th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress (APLAR) International Convention Center (ICC), Jeju, Korea 9/11-15, 2004
22. Masuko-Hongo K, Murata M, Nakamura H, Yudoh K, Kato T, Nishioka K.: Mast cell-derived serine protease tryptase induces production of vascular endothelial growth factor by chondrocytes via protease-activated receptor-2: A possible role in the OA pathogenesis. The 11th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress (APLAR) International Convention Center (ICC), Jeju, Korea

- 9/11-15, 2004
23. Xiang Y, Sekine T, Nakamura H, Masuko-Hongo K, Yudoh K, Nishioka K, Kato T.: Expression of the fibulin family and its regulation by IL-1 β , TNF- α and TGF- β in osteoarthritic articular chondrocytes. The 11th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress (APLAR) International Convention Center (ICC), Jeju, Korea 9/11-15, 2004
 24. Xiang Y, Sekine T, Nakamura H, Masuko-Hongo K, Yudoh K, Nishioka K, Kato T.: PAR-2 expressed in osteoarthritic articular chondrocytes is regulated by IL-1 β /TNF- α and TGF- β . The 11th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress (APLAR) International Convention Center (ICC), Jeju, Korea 9/11-15, 2004
 25. Nakamura H, Shibakawa A, Masuko-Hongo K, Yudoh K, Kato T, Beppu M, Nishioka K.: Subchondral pit formatin and invading bone marrow cells are involved in the articular destruction in osteoarthritis and rheumatoid arthritis expressig cytokines and MMPs. The 11th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress (APLAR) International Convention Center (ICC), Jeju, Korea 9/11-15, 2004
 26. Sekine T, Nakamura H, Masuko-Hongo K, Yudoh K, Nishioka K, Kato T.: Comprehensive analysis of proteins released from chondrocytes by IL-1 β . American College of Rheumatology, 68th Annual Scientific Meeting San Antonio, Texas 10/16-21, 2004
 27. Xiang Y, Sekine T, Nakamura H, Masuko-Hongo K, Yudoh K, Nishioka K, Kato T.: PAR-2 expressed in osteoarthritic articular chondrocytes is regulated by IL-1 beta, TNF-alpha and TGF-beta. American College of Rheumatology, 68th Annual Scientific Meeting San Antonio, Texas 10/16-21, 2004
 28. Matsuo K, Nakamura H, Masuko-Hongo K, Yudoh K, Noyori K, Saito T, Nishioka K, Kato T.: Surveillance of citrullinated autoantigens of synovium in rheumatoid arthritis. American College of Rheumatology, 68th Annual Scientific Meeting San Antonio, Texas 10/16-21, 2004
 29. Nakamura H, Shibakawa A, Beppu M, Masuko-Hongo K, Yudoh K, Kato T, Nishioka K.: Subchondral pit formatin and invading bone marrow cells are involved in the articular destruction in osteoarthritis and rheumatoid arthritis expressig cytokines and MMPs. American College of Rheumatology, 68th Annual Scientific Meeting San Antonio, Texas 10/16-21, 2004
 30. Karasawa R, Ooka S, Sekine T, Nishimura H, Nukina N, Mitsui K, Ozaki S, Nishioka K, Kato T.: Targets of anti-endothelial cell antibodies in patients with systemic vasculitis: identification by the proteomic approach. American College of Rheumatology, 68th Annual Scientific Meeting San Antonio, Texas 10/16-21, 2004
 31. Yudoh K, Dai SM, Shan ZZ, Nakamura H, Masuko-Hongo K, Kato T, Matsuno H, Nishioka K.: Potential implication of catabolic stress-induced chondrocyte senescence in the patogenesis of OA: articular cartilage aging is mediated by stress-induced expression of caveolin-1 in OA chondrocytes. American College of Rheumatology, 68th Annual Scientific Meeting San Antonio, Texas 10/16-21, 2004
 32. Yudoh K, Trieu vN, Nakamura H, Masuko-Hongo K, Kato T, Matsuno H, Nishioka K.: Role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α in chondrocyte viability and survival in OA cartilage. American College of Rheumatology, 68th Annual Scientific Meeting San Antonio, Texas 10/16-21, 2004
 33. Masuko-Hongo K, Murata M, Nakamura H, Yudoh K, Kato T, Nishioka K.: Mast cell-derived serine protease tryptase induces production of vascular endothelial growth factor by chondrocytes via protease-activated receptor-2: A possible role in the OA pathogenesis. American College of Rheumatology, 68th Annual Scientific Meeting San Antonio, Texas 10/16-21, 2004
 34. Nishioka M, Fukuda K, Nakamura H, Kato T, Usui C, Arai H, Nishioka K.: Potential effect of neurotrophin (R) for pain with fibromyalgia. American College of Rheumatology, 68th Annual Scientific Meeting San Antonio, Texas 10/16-21, 2004
 35. Kato T, Nakamura H, Masuko-Hongo K, Yudoh K, Nishioka K.: Proteome analysis of peripheral B cells in rheumatoid arthritis. American College of Rheumatology, 68th Annual Scientific Meeting San Antonio, Texas 10/16-21, 2004
 36. Nakano H, Ooka S, Matsuda T, Sekine T, Nishioka K, Ozaki S, Kato T. Identification of cofilin-1 as an autoantigen in patients with Behcet's disease by a proteomic approach. 11th International Congress of Behcet's Disease. 2004.10
 37. Matsuo K, Nakamura H, Masuko-Hongo K, Yudoh K, Noyori K, Saito T, Nishioka K, Kato T: The phosphoproteome profile of synoviocytes in rheumatoid arthritis is distinct from that in osteoarthritis. American College of Rheumatology, 68th Annual Scientific Meeting San Antonio, Texas 10/16-21, 2004
 38. 加藤智啓、中村洋、増子佳世、遊道和雄、山田秀裕、尾崎承一、西岡久寿樹関節リウマチにおける末梢血B細胞プロテオーム 第34回日本免疫学会 2004.12.
 39. 唐澤里江、大岡正道、関根太一、西村裕之、尾崎承一、西岡久寿樹、加藤智啓。全身性血管炎患者における抗内皮細胞抗体の対応抗原同定ープロテオミクスの手法を用いてー 第34回日本免疫学会 2004.12.
- 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。

血管炎発症機構に関与する CD69 分子

分担研究者 鈴木和男 国立感染症研究所生物活性物質室長

研究要旨

平成16年度の血管炎発症機序の解析の基礎研究として、活性化好中球表面に発現する CD69 の関与について検討した。CD69 ノックアウトマウスを用いた解析から、血管炎発症に CD69 分子の関与が明らかになった。また、CD69 分子欠損による活性酸素誘導の血小板凝集が遅延した。この結果から血管炎発症に、好中球活性化による CD69 分子の表面出現による血小板凝集が関わっていると推定される。

A. 研究目的

血管炎の発症の要因に、活性化した好中球の関与が推定されている (Arimura, Y., Minoshima, S., Kamiya, Y., Tanaka, U., Nakabayashi, K., Kitamoto, K., Nagasawa, T., Sasaki, T., and Suzuki, K. Serum myeloperoxidase and serum cytokines in anti-myeloperoxidase antibody-associated glomerulonephritis. *Clinical Nephrology* 40, 256-264, 1993, L. Harper, D. Radford, T. Plant, M. Drayson, D. Adu, and C. O. S. Savage. IgG From Myeloperoxidase- Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Positive Patients Stimulates Greater Activation of Primed Neutrophils Than IgG From Proteinase 3-Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Positive Patients. *Arthritis Rheumatism* 44:921-930, 2001)。この活性化好中球における CD69 分子のかかわりが見逃せない。事実、関節リウマチ(RA)、

全身性エリテマトーデス(SLE)等の血管炎を認める疾患の患者の血中に抗 CD69 自己抗体が検出されており(X. Yu, T. Matsui, M. Otsuka, T. Sekin., K. Yamamoto, K. Nishioka, T. Kato. Anti-CD69 Autoantibodies Cross-React with Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 2 in Systemic Autoimmune Diseases. *J. Immunol.* 166: 1360-1369, 2001)、特に、RA 患者においては、滑膜中、末梢血中の好中球の CD69 分子が細胞膜上に表出していることが最近報告された (Atzeni F et al. CD69 expression on neutrophils from patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 22:331-334, 2004)。一方、抗タイプ II コラーゲン抗体の静脈注射により誘導される関節炎が、CD69-KO マウスでは発症せず、滑膜に好中球が浸潤しないが、Wild-type マウス由来の好中球を静脈注射すると滑膜での炎症が発生することから、活性化好中球の CD69 分子が炎症反応に関与している可能性が示唆されている

(Murata et al. Int Immunol. 115:987-92, 2003)。

これらの報告は、好中球に発現する CD69 分子と炎症との関連を示唆するものである。

CD16 分子は、タイプ_膜貫通型 C 型レクチン糖タンパク質であり、好中球をはじめ、活性化した T 細胞、B 細胞、NK 細胞、好酸球の細胞膜表面に移行・局在することが知られており、血小板表面には恒常的に存在しており、CD69 陽性の活性化好中球が血管炎発症との関連があると予想される。

そこで、本年度は、これまでの 2 年間の実績をベースに、CD69-KO マウスを使って、CD69 分子が血管炎発症や病態とどのように関わっているかを血管炎の発症率により調べた。また、本分子が血管炎発症に関与する血小板凝集にどのように影響しているかを調べた。

B. 研究方法

1. CAWSによるマウス血管炎発症

CAWS(*Candida albicans* water soluble fraction、カンジダ標準株 IFO1385 由来) 4mg/0.2mL/mouse を腹腔内に 5 日間連続接種し、28 日目に解剖し、心採血(ヘパリン処理)・解剖した。採血後、開腹し、脾臓を摘出・秤量した。各臓器は、10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定した。臓器の標本の作製、血管炎の評価は、協力研究者の高橋啓(東邦大学医学部大橋病院病理)が中心となって解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験にあたっては、国立感染症実験動物計画委員会の動物愛護の指針にもとづいて行った。

C. 研究結果

1. CD69-KO マウスにおける血管炎発症の抑制

CD69-KO マウス(n=8)において、CAWS 誘導血管炎の発症頻度が Wild(N=9)の 63%と有意に低下した。

2. CD69-KO マウスにおける活性酸素誘導の血栓形成の抑制

また、CD69-KO マウスでの血栓形成についても検討し、血管内への活性酸素誘導の血栓形成による血流遮断の有意な遅延が生じた(表 1)。

表 1. 血栓形成の遅延

Thrombus Formation	
CD69 +/+ (C57BL/6)	CD69-KO
6 min	17 min

3. サイトカイン変動

さらに、CAWS 誘導の血管炎発症初期のサイトカイン変動を解析したところ、好中球数の増加と活性化に伴い、特に、

IL-12p70, IL-1_β および IL-10 が著明に増加した。

D. 考察

1. 血管炎発症に関する好中球 CD69 の解析

CD69-KO マウスによる *in vivo* での解析から、血管炎の発症頻度の低下と活性酸素誘導の血栓形成による血流遮断の遅延の結果が得られた。このことは、血管炎発症初期において血小板凝集がおこり、それによっておこる血管炎発症に CD69 分子が関与することが強く示唆された。また、血管炎発症初期の IL-12p70, IL-1_β および IL-10 が著明な増加が認められたことから、初期反応において、好中球の活性化と連動していることが示唆された。この血管炎発症と活性酸素誘導の血小板凝集に好中球の関与が示唆された。また、*in vitro* において、ヒト末梢血好中球が、好中球走化性因子 fMet-Leu-Phe、炎症性サイトカイン TNF- α および IL-1 β で刺激した細胞表面に CD69 分子が細胞膜周囲に表出したことが認められことから、好中球の活性化によって表面に存在する CD69 分子が血小板の凝集を誘導すると推定される。

この活性化において、活性化好中球の表面に CD69 分子が移行することが初期反応に重要であり、活性化好中球表面に出る CD69 分子が、炎症性サイトカインレベルの上昇と連動し、好中球の炎症反応とともに血栓形成に続いて、血管炎が

進展することに CD69 分子の関与が強く示唆された。

本研究は、高橋啓（協力研究者）とともに施行し、平成16年度の成果を得た。血管炎発症に関する要因の解析では、新たに好中球 CD69 の関与が示唆された。また、本研究は、分担者と協力研究者に加え、村山研（国立感染研・生物活性物質、東京理科大・理工）、長尾朋和（国立感染研・生物活性物質、現コーネル大・医（ニューヨーク））、大原関利章（東邦大・医・大橋病院・病理）、長谷川明洋（千葉大院医）、大川原明子（国立感染研・生物活性物質）、三浦典子（東京薬大・薬）、松村実美子（国立感染研・生物活性物質、慶應大・院理工）、山岸舞（東京大院薬）、直江史郎（東邦大・医・大橋病院・病理）、村田薫（千葉大院医）、船津高志（東京大院薬）、大野尚仁（東京薬大・薬）、南谷晴之（慶應大・院理工）、中山俊憲（千葉大院医）、新井孝夫（東京理科大・理工）の多数の施設の先生方の協力によった。

E. 結論

血管炎発症初期において血小板凝集がおこり、それによっておこる血管炎に CD69 分子が関与することが強く示唆された。この凝集と血管炎発症に CD69 分子を含めた好中球の活性化が連動していることが示唆された。この好中球の活性化には、TNF- α および IL-1 β などのサイトカインによって CD69 分子が細胞膜周囲に表出することに起因し、血小板の凝集を誘導すると推定される。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. T. Oharaseki, Y. Kameoka, F. Kura, A.S. Persad, K. Suzuki, S. Naoe. Susceptibility loci to coronary arteritis in animal model of Kawasaki disease induced with *Candida albicans*-derived substances. Microbiol.Immunol. in press.
2. A. Hoshino, K. Fujioka, T. Oku, S. Nakayama, M. Suga, Y. Yamaguchi, K. Suzuki, K., M. Yasuhara, K. Yamamoto. Quantum dots targeted to the assigned organelle in living cells Microbiol. Immunol. 48: 985-994, 2004
3. N. Nagai-Miura, Y. Shingo, Y. Adachi, A. Ishida-Okawara, T. Oharaseki, K. Takahashi, S. Naoe, K. Suzuki and N. Ohno. Induction of Coronary Arteritis with Administration of CAWS (*Candida albicans* Water-Soluble Fraction) Depending on Mouse Strains. Immunopharmacol. Immunotoxicol. 26:527-543, 2004.
4. Y. Kameoka, A. S. Persad and K. Suzuki. Genomic variations in myeloperoxidase gene in the Japanese population. Jpn. J. Infect. Dis. 57: S12-13, 2004
5. Y. Aratani, F. Kura, H. Watanabe, H. Akagawa, Y. Takano, K. Suzuki, M.C. Dinauer, N. Maeda, and H. Koyama. In vivo role of myeloperoxidase for the host defense. Jpn. J. Infect. Dis. 57: S15, 2004
6. E. Muso, T. Ito-Ihara, T. Ono, E. Imai, K. Yamagata, A. Akamatsu, K. Suzuki. Intravenous immunoglobulin (IVIg) therapy in MPO-ANCA related polyangiitis with rapidly progressive glomerulonephritis in Japan. Jpn. J. Infect. Dis. 57: S17-18, 2004
7. Shiohara A, Hoshino A, Hanaki K, Suzuki K, and Yamamoto K. On the cyto-toxicity caused by quantum dots. Microbiol.Immunol.48:669-676, 2004.
8. Ito, M., Nagata, N., Yumoto, F., Yamagoe, S., Suzuki, K., Adachi, K. and Tanokura, M.: ¹H, ¹³C, ¹⁵N resonance assignments of the cytokine LECT2. Journal of Biomolecular NMR 29:543-544, 2004.
9. C. Ovejero, C. Cavard, A. Perianin, T. Hakvoort, J. Vermeulen, C. Godard, M. Fabre, P. Chafey, K. Suzuki, B. Romagnolo, S. Yamagoe, C. Perret. Identification of the leukocyte cell-derived chemotaxin2 (LECT2) as a direct target gene of s-catenin in the liver. Hepatology 40:167-176, 2004.
10. T. Saito, A. Okumura, H. Watanabe, M. Asano, A. Ishida-Okawara, J. Sakagami, K. Sudo, Y. Hatano-Yokoe, T. Abo, Y. Iwakura, K. Suzuki, and S. Yamagoe. Increase of Hepatic NKT Cells in LECT2-Deficient Mice Contributes to Severe Concanavalin A-Induced Hepatitis. J Immunol. 173:579-585, 2004.
11. S. Suzuki, K. Honma, T. Matsuyama, K. Suzuki, K. Toriyama, K. Yamamoto, K. Miyazaki, M. Nakamura, K. Yu, A. Kumatori. Critical roles of Interferon regulatory factor-4

- in CD11b^{high}CD8⁻ dendritic cell development
Proc Natl Acad Sci USA. 101:8981-8986,
2004.
12. A. Ishida-Okawara, T. Ito-Ihara, E. Muso, T. Ono, K. Saiga, K. Nemoto, K. Suzuki. Neutrophil contribution to the crescentic glomerulonephritis in SCG/Kj mice. *Nephrol., Dial. Transplant.* 19:1708-1715, 2004.
 13. 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* 327: 195-200, 2004.
 14. 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.
- 和文発表
1. 鈴木和男「バイオイメージングが切り開く新たな診断・治療評価技術」*医学のあゆみ* 210巻 171
 2. 長尾朋和、鈴木和男「血管炎初期反応のイメージング」*医学のあゆみ* 210巻 196-199
 3. 長尾朋和、村山 研、越尾 修、大野尚仁、三浦典子、高橋 啓、馬淵綾子、南谷晴之、鈴木和男 腎臓血管傷害のイメージング *PharmaMedica*22: 185-189, 2004 (医療薬学雑誌)
2. 学会発表
国際会議
1. Kazuo Suzuki, Eri Muso, Shigeto Kobayashi, Toshiko Ito-Ihara, David Scott, Richard Watts, Oliver Flossmann, Suzanne Lane, and David Jayne. Japan-UK Vasculitis Epidemiology Study - First meeting, Emmanuel College, Cambridge, UK
 2. Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., Dinauer, M., Maeda, N., and Koyama, H: In vivo role of myeloperoxidase for the host defense. The 4th international Peroxidase Meeting, October, 2004 (Japan).
 3. Suzuki K, Muso E, Nauseef WM: Contribution of peroxidases in host-defense, diseases and cellular functions. The 4th International Peroxidase Meeting, Joint with the 10th Myeloperoxidase Meeting 2004.10.27-30 (Kyoto)
 4. Muso E, Ito-Ihara T, Ono T, Imai E, Yamagata K, Akamatsu A, Suzuki K: Intravenous immunoglobulin (IVIg) therapy in MPO-ANCA related polyangiitis with rapidly progressive glomerulonephritis in Japan 2004. The 4th International Peroxidase Meeting, Joint with the 10th Myeloperoxidase Meeting 2004.10.27-30, Kyoto
 5. Akiyoshi Hoshino, Akiko Ishida-Okawara, Toshiko Ito-Ihara, Eri Muso, Masato Yasuhara, Taeko Dohi, Kenji Yamamoto, and Kazuo SUZUKI Fluorescent labeling of cells and biomolecules with nanocrystal quantum dots - MPO expressed on surface of activated

neutrophils with Quantum dot-conjugated antibody. 4th International Peroxidase Meeting. Oct 27-30, 2004, Kyoto

国内会議

1. 村山研、長尾朋和、鞍馬秀輝、長谷川明洋、船津高志、南谷晴之、新井孝夫、中山俊憲、鈴木和男 血管炎における活性化好中球の CD69 分子 第 3 4 回京都腎臓免疫研究会、京都、5 月 22 日
2. 宇野賀津子、猪原登志子、田原佐知子、田中麻理、米本智美、塚本達雄、深津敦司、鈴木和男、岸田綱太郎、武曾恵理 腎炎患者における末梢血リンパ球分面の IL12/IL18 への反応性の検討 第 3 4 回京都腎臓免疫研究会、京都、5 月 22 日
3. 猪原登志子、小野孝彦、深津敦司、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 15 例における治療効果と 6 ヶ月予後の検討。第 47 回日本腎臓病学会学術総会。平成 16 年 5 月 27 日。栃木
4. 大原関利章、横内 幸、若山 恵、三浦典子、鈴木和男、大野尚仁、直江史郎、村田久雄、高橋 啓 カンジダ誘導マウス動脈炎モデルにおける動脈炎成立過程の組織学的検討 第 93 回日本病理学会総会、2004/6/9-11、札幌
5. 活性化好中球による血管炎発症への関与_MPO-ANCA による糸球体内皮細胞傷害_生体防御機能異常ワークショップ 2004、2004 年 6 月 17~18 日 (沖縄)
6. 長尾朋和、松村実美子、馬淵綾子、越尾修、南谷晴之、鈴木和男 MPO-ANCA の糸球体内皮細胞への作用 生体防御機能異常ワークショップ 2004、2004 年 6 月 17~18 日 (沖縄)
7. 荒谷康昭、倉 文明、渡辺治雄、高野幸枝、鈴木和男、小山秀機 ミエロペルオキシダーゼと真菌感染 生体防御機能異常ワークショップ 2004、2004 年 6 月 17~18 日、(沖縄)
8. 荒谷康昭、倉 文明、渡辺治雄、高野幸枝、鈴木和男、小山秀機 ミエロペルオキシダーゼ欠損マウスの生体防御能 第 26 回 日本フリーラジカル学会学術集会、2004 年 6 月 24~25 日 (山形)
9. 大原関利章、高橋 啓、三浦典子、大川原明子、村山 研、土田和徳、金城義明、金子健二、大野尚仁、鈴木和男 川崎病類似マウス系統的動脈炎モデルにおけるヒト免疫グロブリンの治療効果の検討 第 40 回日本小児循環器学会総会、抄録、2004/6/30~7/2、東京
10. 村山研、長尾朋和、鞍馬秀輝、長谷川明洋、船津高志、南谷晴之、新井孝夫、中山俊憲、鈴木和男 第 1 5 回日本生体防御学会 (長崎)「血管炎における活性化好中球の CD69 分子」
11. 長尾朋和、松村実美子、馬淵綾子、越尾修、南谷晴之、鈴木和男 「MPO-ANCA による糸球体内皮細胞の粘着分子 Up-regulation」 第 1 5 回日本生体防御学会 (長崎) 鈴木和男 第 1 1 回代替血液学会 (札幌)「免疫グロブリンの血管炎抑制効果と人工化」
12. 大川原明子、三浦典子、大原関利章、

- 高橋 啓、岡村春樹、大野尚仁、鈴木和男「血管炎を誘導する CAWS 投与初期のマウス好中球活性化とサイトカインの変動」第 69 回日本インターフェロン・サイトカイン学会 (三沢)
13. 小野孝彦、猪原登志子、劉寧、北徹、雑賀寛、根本久一、武曾恵理、大川原明子、鈴木和男 第 16 回腎とフリーラジカル研究会 (京都)「好中球活性化、活性酸素産生とフィブリン沈着を介した SCG/Kj マウスにおける半月体形成機序」
14. Youhei Koshimizu, Satoshi Yamagoe, Kazuo Suzuki, and Michiko Ohtomi. "Expression and localization of LECT2 in mouse brain 第 27 回日本神経科学会・第 47 回日本神経化学会合同大会 (大阪)
15. Akiyoshi Hoshino, Ken Murayama, Akiko Ishida-Okawara, Toshiko Ito-Ihara, Eri Muso, Noriko N. Miura, Naohito Ohno, Masato Yasuhara, Kenji Yamamoto, and Kazuo Suzuki. MPO Expressed on the Surface of Activated Neutrophils with Quantum Dot-conjugated Antibody. 第 13 回バイオイメージング学会学術集会 11/4-6、京都)
16. H. Sankawa, Y. Kameoka, N. Miura, N. Ohno, and K. Suzuki. Gene Expression in Splenocyte Response to CAWS Injection of Two Murine Strains. The 4th International Peroxidase Meeting Joint with the 10th Myeloperoxidase Meeting 2004. 11. 15 京都
17. 三川 浩輝, 亀岡 洋祐, 三浦 典子, 大野 尚仁, 鈴木 和男 cDNA マイクロアレイによる血管炎惹起物質 *C. albicans* 由来菌体外多糖 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会 2004. 12. 01 札幌
18. 三川 浩輝, 亀岡 洋祐, 三浦 典子, 大野 尚仁, 鈴木 和男 cDNA マイクロアレイ解析による血管炎に関する炎症性分子の遺伝子発現 第 27 回日本分子生物学会年会 2004. 12. 08 神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
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

顕微鏡的多発血管炎における HLA 領域遺伝子と KIR 遺伝子群の関連解析
分担研究者 土屋尚之 東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学分野助教授

研究要旨

われわれは昨年までに、日本人顕微鏡的多発血管炎(MPA)における HLA-DRB1*0901-DQB1*0303 ハプロタイプの関連を報告してきた。本年度は、HLA 領域における疾患感受性領域をさらに解析するために、HLA-B, C, DPB1 遺伝子の検討を加えた。DRB1*0901-DBB1*0303 ハプロタイプが HLA 領域における主要な疾患感受性因子であることが確認された一方、このハプロタイプと拡張ハプロタイプを形成する対立遺伝子のうちで、DPB1*0201, Cw*0303, B*15111 の増加傾向が観察された。また、DRB1*0901-DQB1*0303-DPB1*0201 ハプロタイプのオッズ比は、DRB1*0901, DQB1*0303 単独より高い傾向が認められた。以上の結果から、MPA 疾患感受性における HLA 領域遺伝子の寄与は主として DR-DQ 領域によって説明しうるものの、ほかの HLA 領域遺伝子座の寄与も存在する可能性が示唆された。

また、HLA-class I をリガンドとする KIR(killer cell Ig-like receptor)遺伝子群多型の関連を検討したところ、活性化型である KIR2DS1 遺伝子を有する頻度が MPA において低い傾向が認められた。次に、HLA リガンドと KIR 遺伝子の組み合わせについて検討したところ、HLA-Bw4 エピトープとそれに対応する抑制型の KIR 3DL1 が陽性かつ活性化型の KIR 3DS1 が陰性の群が MPA に多い傾向が認められた。以上の結果は、HLA 分子からの抑制シグナルが KIR を介して伝達される一方で活性化シグナルが減弱することが、例えばウイルス感染に対する抵抗性の減弱を介して疾患感受性に関わる可能性を示唆し、今後、症例数を増やした検討が必要と考えられた。

A. 研究目的

われわれは昨年度までに、日本人集団における顕微鏡的多発血管炎(microscopic polyangiitis, MPA)と HLA-DRB1*0901-DQB1*0303 ハプロタイプの有意な関連を報告した。HLA 領域遺伝子群には顕著な連鎖不平衡が存在するため、病的に関連する遺伝子の特定のためには、疾患に機能的に関連しうる近隣の遺伝子の検討が必要である。本年度は、この目的で、HLA-B, C, DPB1 遺伝子と MPA との関連

研究を行った。

KIR (killer cell immunoglobulin-like receptor)遺伝子群は、NK 細胞や一部の T 細胞に発現する活性化および抑制型受容体をコードする遺伝子群であり、互いに高度の相同性を有する多数の遺伝子からなるクラスターを 19q13.4 に形成する。抑制型受容体のリガンドの少なくとも一つは HLA-class I 分子であり、活性化受容体も HLA-class I を認識することが示唆されているが、他の受容体の存在もまた示唆

されている。KIR には各遺伝子座の塩基配列の違いによる多型のみならず、遺伝子座自体の有無による多型が存在し、近年、関節リウマチに伴う血管炎、尋常性乾癬、乾癬性関節炎、強皮症、I型糖尿病などのリウマチ性疾患・自己免疫疾患や、HIV 感染症、C型肝炎などのウイルス感染症に対する抵抗性との関連が報告され始めている。本研究では、KIR 遺伝子座の有無によって規定される多型と MPA との関連を、リガンドである HLA-B, C との組み合わせを含めて解析した。

B. 研究方法

平成11～13年度の当研究班（橋本博史班長）時に研究協力の同意を得た MPA 50例につき、HLA-B, C, DPB1 遺伝子タイピングを行った。また、MPA45例に対し、KIR 各遺伝子座の有無による多型を、PCR-SSP 法を用いて検討した。得られた結果を、日本人健常者集団の遺伝子型と比較した。遺伝子型と疾患との関連は、 χ^2 検定、および必要なときには Fisher の直接確率検定法を用いて解析した。

（倫理面への配慮）

本研究は、前研究班において収集され、連結不可能匿名化された形で保管されていた検体を、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」（平成13年3月29日文科科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）に則り、「遺伝子研究の同意を得た既収集匿名検体（A群試料）」として本研究において使用するための研究計画の承認を東京大学大学院医学系研究科ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査

委員会に得た上で施行した。

C. 研究結果

HLA-DPB1, C 遺伝子座には、単独で統計学的に有意な関連に到達したアリルは存在しなかったが、DPB1*0201 (odds ratio [OR] 1.38, P=0.30)、B*15111(OR 6.61, P=0.078)、Cw*0303 (OR 1.82, P=0.14)に増加傾向が観察された（表1）。

DRB1*0901-DQB1*0303-DPB1*0201 の三座位ハプロタイプでは、DRB1*0901, DQB1*0303 単独およびその二座位ハプロタイプよりも高い OR が観察された（表1）。

KIR 遺伝子座の有無による多型の検討からは、活性化型受容体である KIR2DS1 の陽性率が、MPA 群で低い傾向が観察された(OR 0.49, P=0.051)（表2）。また、個々の KIR 遺伝子の有無とそのリガンドである HLA-B, C との組み合わせについて検討したところ、リガンドである HLA-Bw4 と抑制型受容体である KIR3DL1 が陽性で、活性化型受容体である KIR3DS1 が陰性の組み合わせが、MPA 群に多い傾向が観察された(OR 2.01, P=0.059)（表3）。

D. 考察

本年度の研究結果から、HLA 領域における MPA の主たる感受性因子は DRB1*0901-DQB1*0303 と考えられるが、増加傾向が観察された DPB1*0201, B*15111, Cw*0303 はそれぞれの遺伝子座において上記ハプロタイプと連鎖不平衡にあるアリルの一つであり、これらも疾患感受性に寄与しているか、あるいは、これらによって形成される拡張ハプロタ

イブ上のいずれかの HLA あるいは非 HLA 遺伝子座のアリルが寄与している可能性も示唆された。

KIR 遺伝子群の解析結果は、検体数が少ないため、予備的な成果であるが、NK 細胞活性化が生じにくい遺伝子型が MPA に関連する傾向が示唆された。

以上の結果から、例えばウイルス感染に対する抵抗性が KIR 遺伝子型により弱い個体において、ウイルス感染が遷延し、HLA-class II を介するウイルス抗原あるいは自己抗原に対する免疫応答が MPO-ANCA 産生や血管炎発症に結びつくのではないかと、という仮説を提唱しうると考えられる。今後、より多数の検体のゲノム DNA 多型解析や、活動性血管炎患者における発現解析から、この仮説を検討する必要があると考えられる。

E. 結論

HLA 領域における MPA の主たる疾患感受性因子は DRB1*0901-DQB1*0303 ハプロタイプである。また、KIR 遺伝子座の有無による多型の解析により、KIR を介した NK 細胞や T 細胞の抑制シグナルの強い遺伝子型が MPA に増加する傾向が観察された。

(研究協力者) 宮下リサ、川崎綾、徳永勝士 (東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学)、屋部登志雄 (東京都赤十字血液センター)、小林茂人、橋本博史 (順天堂大学膠原病内科)、尾崎承一 (聖マリアンナ医大リウマチ・膠原病・アレルギー内科)

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hase H, Kanno Y, Kojima M, Hasegawa K, Sakurai D, Kojima H, Tsuchiya N, Tokunaga K, Masawa N, Azuma M, Okumura K, Kobata T: BAFF/BLyS can potentiate B-cell selection with the B-cell co-receptor complex. *Blood* 103:2257-2265, 2004.

2. Sakurai D, Tsuchiya N, Yamaguchi A, Okaji Y, Tsuno NH, Kobata T, Takahashi K, Tokunaga K: Crucial role of inhibitor of DNA binding/differentiation in the vascular endothelial growth factor-induced activation and angiogenic processes of human endothelial cells. *J Immunol* 173:5801-5809, 2004.

3. Hitomi Y, Tsuchiya N, Kawasaki A, Kyogoku C, Ohashi J, Suzuki T, Fukazawa T, Bejrachandra S, Siriboonrit U, Chandanayingyong D, Suthipinittharm P, Tsao BP, Hashimoto H, Honda Z, Tokunaga K. CD72 polymorphisms associated with alternative splicing modify susceptibility to human systemic lupus erythematosus through epistatic interaction with *FCGR2B*. *Hum Mol Genet* 13: 2907-2917, 2004.

4. Tsuchiya N, Kuroki K, Fujimoto M, Murakami Y, Tedder TF, Tokunaga K, Takehara K, Sato S. Association of functional *CD19* polymorphism with susceptibility to systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 50: 4002-4007, 2004.

5. Ehara Y, Sakurai D, Tsuchiya N, Nakano K, Tanaka Y, Yamaguchi A, Tokunaga K:

Follistatin-related protein gene (*FRP*) is expressed in the synovial tissues of rheumatoid arthritis, but its polymorphisms are not associated with genetic susceptibility. *Clin Exp Rheumatol* 22: 707-712, 2004.

6. Okaji Y, Tsuno NH, Kitayama J, Saito S, Takahashi T, Kawai K, Yazawa K, Asakage M, Tsuchiya T, Sakurai D, Tsuchiya N, Tokunaga K, Takahasshi K, Nagawa H. A novel method for isolation of endothelial cells and macrophages from murine tumors based on Ac-LDL uptake and CD16 expression. *J Immunological Methods* 295:183-193, 2004.

7. Tsuchiya N, Kyogoku C: Role of Fcγ Receptor IIb polymorphism in the genetic background of systemic lupus erythematosus: Insights from Asia. *Autoimmunity* (in press)

2. 学会発表

1. 土屋尚之：顕微鏡的多発血管炎の疾患感受性遺伝子解析。第48回日本リウマチ学会総会・学術集会 抄録集 p105. 2004年4月15日～17日、岡山。

2. 江原幸和、土屋尚之、櫻井大祐、山口晃弘、松多邦雄、徳永勝士：ヒト follistatin-related protein (*FRP*)遺伝子多型の関節リウマチとの関連の検討。第48回日本リウマチ学会総会・学術集会 抄録集 p152. 2004年4月15日～17日、岡山。

3. 人見祐基、土屋尚之、川崎綾、深沢徹、松多邦雄、Betty P. Tsao, 橋本博史、徳永勝士：ヒト CD72 遺伝子の多型解析と、

全身性エリテマトーデスおよび関節リウマチとの関連の検討。第48回日本リウマチ学会総会・学術集会 抄録集 p175. 2004年4月15日～17日、岡山。

4. 黒木喜美子、土屋尚之、松多邦雄、深沢徹、十字猛夫、橋本博史、徳永勝士：白血球免疫グロブリン様受容体 LILRA1(LIR6)遺伝子多型と日本人 SLE との関連。第48回日本リウマチ学会総会・学術集会 抄録集 p175. 2004年4月15日～17日、岡山。

5. 川崎綾、土屋尚之、深沢徹、松多邦雄、橋本博史、徳永勝士：APRIL 遺伝子多型と関節リウマチ、全身性エリテマトーデスとの関連の検討。第48回日本リウマチ学会総会・学術集会 抄録集 p181. 2004年4月15日～17日、岡山。

6. 申栄吉、櫻井大祐、土屋尚之、川崎綾、小端哲二、徳永勝士：ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞における BLYS(BAFF)発現。第48回日本リウマチ学会総会・学術集会 抄録集 p284. 2004年4月15日～17日、岡山。

7. 櫻井大祐、土屋尚之、山口晃弘、小端哲二、徳永勝士：VEGF 誘導性血管内皮細胞活性化および血管新生誘導における ID 遺伝子の役割。第48回日本リウマチ学会総会・学術集会 抄録集 p299. 2004年4月15日～17日、岡山。

8. 人見祐基、土屋尚之、川崎綾、京極千恵子、大橋順、鈴木毅、深沢徹、Sasitorn Bejrachandra, Dasnayane Chandanayingyong, Puan Suthipinittharm, Betty P. Tsao, 橋本博史、本田善一郎、徳永勝士：SLE 感受性におけるヒト CD72 遺伝子多型およびヒト FcγR2B 遺伝子多

型の遺伝子間相互作用。日本人類遺伝学会第49回大会抄録集 p107 (2004年10月12日~15日)。

9. 土屋尚之、黒木喜美子、村上善則、藤本学、Thomas F. Tedder、徳永勝士、竹原和彦、佐藤伸一：CD19の機能的多型と全身性強皮症との関連。日本人類遺伝学会第49回大会抄録集 p148 (2004年10月12日~15日)。

10. Tsuchiya N, Kuroki K, Murakami Y, Fujimoto M, Tedder TF, Tokunaga K, Takehara K, Sato S: Association of functional *CD19* promoter polymorphism with susceptibility to systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 50(Suppl.): S125, 2004.

11. Kawasaki A, Tsuchiya N, Fukazawa T, Matsuta K, Murakami Y, Hashimoto H, Tokunaga K. APRIL (TNFSF13) polymorphisms: in systemic lupus erythematosus: Independent confirmation of association with susceptibility and new association with clinical characteristics. *Arthritis Rheum* 50(Suppl.): S120, 2004. *Arthritis Rheum* 50(Suppl.): S203, 2004.

12. Hitomi Y, Tsuchiya N, Kawasaki A, Kyogoku C, Ohashi J, Suzuki T, Fukazawa T, Bejrachandra S, Chandanayingyong D, Suthipinittharm P, Tsao BP, Hashimoto H, Honda Z, Tokunaga K: Epistatic interaction between *CD72* and *FCGR2B* polymorphisms in conferring susceptibility to human systemic lupus erythematosus (SLE). *Arthritis Rheum* 50(Suppl.): S120, 2004.

13. Kusaoi M, Fukazawa T, Hirashima M, Morita Y, Morita T, Tsuchiya N, Tokunaga K, Inoko H, Hashimoto H: Genomic screening

with high density microsatellite markers for systemic lupus erythematosus on chromosome 1. *Arthritis Rheum* 50(Suppl.): S121, 2004.

14. 申栄吉、土屋尚之、櫻井大祐、長谷英徳、津野寛和、高橋孝喜、小端哲二、徳永勝士 (2004) 血管内皮細胞および血管平滑筋細胞におけるBAFF(BLyS)発現。第34回日本免疫学会 (学術集会記録 p162)

15. 黒木喜美子、土屋尚之、白石充典、ラズバラリンダ、山下由美、小池隆夫、神田大輔、徳永勝士、前仲勝実 (2004) 関節リウマチ (RA) 関連 Leukocyte Immunoglobulin-like receptor 1 ハプロタイプの構造・発現解析。第34回日本免疫学会 (学術集会記録 p162)

16. 川崎綾、土屋尚之、深沢徹、橋本博史、徳永勝士 (2004) APRIL(TNFSF13)遺伝子多型とSLE発症および病態との関連の解析。第34回日本免疫学会 (学術集会記録 p279)

17. 人見祐基、土屋尚之、川崎綾、鈴木毅、深沢徹、Bejrachandra S, Chandanayingyong D, Suthipinittharm P, Tsao BP, 橋本博史、本田善一郎、徳永勝士 (2004) SLE感受性におけるヒトCD72遺伝子多型およびヒトFCGR2B遺伝子多型の遺伝子間相互作用。第34回日本免疫学会 (学術集会記録 p279)

18. 土屋尚之、黒木喜美子、藤本学、Tedder TF、徳永勝士、佐藤伸一 (2004) ヒトCD19多型と強皮症との関連。第34回日本免疫学会 (学術集会記録 p284)

19. 宮下リサ、土屋尚之、屋部登志雄、小林茂人、橋本博史、尾崎承一、徳永勝士 (2004) KIR 遺伝子多型と顕微鏡的多発血