

- International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, San Francisco. AIDS Res. Hum. Retroviruses 19: S38-39, 2003.
- 8) Miyatake Y, Ikeda H, Yoshiki T. cDNA array analysis of the host gene expression in spinal cords of rats with HTLV-I infection. 11th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, San Francisco. AIDS Res. Hum. Retroviruses 19: S66, 2003.
- 9) Otsuka N, Ikeda H, Tanaka S, Ishizu A, Yoshiki T. Tissue specific expression of the env protein in fetus rats carrying a full length HERV-R gene. 11th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, San Francisco. AIDS Res Hum Retroviruses 19: S67, 2003.
- 10) Ikeda H, Abe A, Ishizu A, Hayase H, Yoshiki T. A transgenic rat model of HTLV-I induced immunological diseases: effect of the env-pX transgene to effector cells and target tissues in collagen induced arthritis. 11th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, San Francisco. AIDS Res Hum Retroviruses 19: S68, 2003.
- 11) Ikeda H, Zhao X, Miyatake Y, Yoshiki T. Comparison of host gene expression during HIV-1 infection in human and rat cells. 11th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, San Francisco. AIDS Res Hum Retroviruses 19: S68-69, 2003.
- 12) Tsuji T, Ikeda H, Ishizu A, Takahashi T, Yoshiki T. Malignant transformation of epithelial thymoma developed in HTLV-I pX transgenic rat by heterotopic transplantation and its molecular analysis. 11th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, San Francisco. AIDS Res Hum Retroviruses 19: S71-72, 2003.
- 13) 吉木 敬: 血管炎症候群の病理と病因—モデル動物からみた考察—シンポジウム 2「新たな血管研究の展開」第 92 回日本病理学会総会, 福岡. 日本病理学会会誌 92: 140, 2003.
- 14) 石津明洋、富居一範、早瀬広子、樋口正人、阿部麻美、辻 宗啓、辻 隆裕、高橋利幸、池田 仁、吉木 敬: HTLV-I env-pX 遺伝子導入ラットに認める免疫異常と自己免疫疾患の発症. 第 92 回日本病理学会総会, 福岡. 日本病理学会会誌 92: 167, 2003.
- 15) 石津明洋: Dominant Negative ATF-1 を組み込んだシンビスウイルスベクターによる関節リウマチの遺伝子治療モデル. シンポジウム-11「リウマチの動物モデルと遺伝子治療」第 47 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 東京. リウマチ 43: 235, 2003.
- 16) 石津明洋、富居一範、早瀬広子、阿部麻美、辻 宗啓、宮武由甲子、池田仁、吉木 敬: 壊死性血管炎の発症における胸腺の関与について. 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. 第 6 回肝臓生物学研究会合同年会, 札幌. プログラム p45, 2003.
- 17) 外丸詩野、山野嘉久、吉木 敬: 抗原特異的 T リンパ球の新たな検出法: T リンパ球によるペプチド-HLA-GFP 複合体の獲得. 第 2 回 HTLV/ATL 研究会. 文部科学省特定領域研究「がん」がん疫学総括班 ATL 研究推進委員会, 2003.

- 18) 阿部麻美、石津明洋、辻 宗啓、早瀬広子、菅谷壽晃、鈴木 昭、高橋利幸、池田 仁、吉木 敬：HTLV-I env-pX 遺伝子導入ラットに認める関節炎の発症ならびに持続機序に関する検討. 第 47 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 東京. リウマチ 43: 411, 2003.
- 19) 阿部麻美、石津明洋、辻 宗啓、早瀬広子、菅谷壽晃、鈴木 昭、辻 隆裕、高橋利幸、池田 仁、吉木 敬：コラーゲン関節炎誘導による HTLV-I env-pX 遺伝子導入ラットの関節炎発症および持続機序の検討. 第 92 回日本病理学会総会, 福岡. 日本病理学会会誌 92: 223, 2003.
- 20) 辻 隆裕、池田 仁、石津明洋、高橋利幸、吉木 敬：異所性移植による HTLV-I pX トランスジェニックラット胸腺腫の悪性転化とその遺伝子解析. 第 92 回日本病理学会総会, 福岡. 日本病理学会会誌 92: 244, 2003.
- 21) 趙 旭東、池田 仁、宮武由甲子、山本友希代、立野正敏、吉木 敬：ヒトおよび HIV-1 感染関連遺伝子導入ラット細胞への HIV-1 感染による宿主遺伝子発現の解析. 第 92 回日本病理学会総会, 福岡. 日本病理学会会誌 92: 248, 2003.
- 22) 大塚紀幸、田中 敏、山本友希代、石津明洋、池田 仁、吉木 敬：HERV-R トランスジェニックラットにおける Env 蛋白発現と抗原性の解析. 第 92 回日本病理学会総会, 福岡. 日本病理学会会誌 92: 256, 2003.
- 23) 宮武由甲子、池田 仁、石津明洋、高橋利幸、吉木 敬：検体摂取後の室温放置による cDNA アレイ解析結果への影響. 第 92 回日本病理学会総会, 福岡. 日本病理学会会誌 92: 285, 2003.
- 24) 山本友希代、池田 仁、石津明洋、辻 隆裕、高橋利幸、吉木 敬：TNF- α およびステロイド投与によるヒト培養血管内皮細胞の遺伝子発現への影響. 第 92 回日本病理学会総会, 福岡. 日本病理学会会誌 92: 291, 2003.
- 25) 辻 隆裕、池田 仁、外丸詩野、石津明洋、吉木 敬：HTLV-I pX トランスジェニックラット胸腺腫の悪性化と p16 遺伝子異常の解析. 第 62 回日本癌学会総会, 名古屋. Jpn J Cancer Res 94 (Suppl): 241, 2003.
- 26) 外丸詩野、山野嘉久、石津明洋、池田 仁、吉木 敬：HTLV-I env 領域における CD8+T 細胞エピトープの同定：抗原特異的 T リンパ球の新たな検出法. 第 62 回日本癌学会総会, 名古屋. Jpn J Cancer Res 94 (Suppl): 242, 2003.
- 27) 早瀬広子、石津明洋、宮武由甲子、外丸詩野、池田 仁、吉木 敬：HTLV-I トランスジェニックラットにおける CD25+4+ regulatory T cell の解析. 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会, 福岡. 日本免疫学会総会・学術集会記録 33: 42, 2003.
- 28) 外丸詩野、山野嘉久、吉木 敬：ペプチド/HLA 複合体の抗原特異的 T 細胞による獲得：抗原提示の新しい増幅メカニズム. 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会, 福岡. 日本免疫学会総会・学術集会記録 33: 270, 2003.
- 29) 石津明洋、早瀬広子、宮武由甲子、富居一範、樋口正人、阿部麻美、外丸詩野、池田 仁、吉木 敬：自己免疫疾患モデルとしての HTLV-1 env-pX 遺伝子導入ラット. 第 93 回日本病理学会総会, 札幌. 日本病理学会会誌 93: 163, 2004.
- 30) 外丸詩野、山野嘉久、石津明洋、池田 仁、吉木 敬：ペプチド/HLA 複合体の抗原特異的 T 細胞による獲得：抗

- 2004.
- 33) 宮武由甲子、外丸詩野、石津明洋、池田 仁、吉木 敬：HTLV-1 感染による HAM 感受性ラットおよび抵抗性ラットの脊髄における遺伝子発現の解析. 第 93 回日本病理学会総会, 札幌. 日本病理学会誌 93: 249, 2004.
- 34) 早瀬広子、石津明洋、宮武由甲子、外丸詩野、池田 仁、吉木 敬：HTLV-I トランスジェニックラットにおける CD4+CD25+regulatory T cell の解析. 第 93 回日本病理学会総会, 札幌. 日本病理学会誌 93: 294, 2004.
- 35) 伊藤僚子、吉木 敬、池田 仁、石津明洋、外丸詩野：ヒト大腸癌培養株 DLD-1 細胞とその 5-FU 耐性株の比較. 第 93 回日本病理学会総会, 札幌. 日本病理学会誌 93: 304, 2004.
- 36) 宮武由甲子、池田 仁、鈴木 昭、馬場智久、道又理恵、外丸詩野、石津明洋、吉木 敬：HTLV-1 感染による HAM ラット病感受性および抵抗性は脊髄における宿主の対ウイルス反応性に依存する. 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会, 札幌. 日本免疫学会総会・学術集会記録 34: 95, 2004.
- 37) 外丸詩野、山野嘉久、石津明洋、吉木 敬：T 細胞による抗原提示と免疫抑制機構. 第 34 回日本免疫学会・学術集会, 札幌. 日本免疫学会総会・学術集会記録 34: 100, 2004.
- 38) 馬場智久、石津明洋、宮武由甲子、鈴木 昭、外丸詩野、池田 仁、吉木 敬：HTLV-1pX 遺伝子導入ラットと正常 Wistar ラットの交配種における胸腺異常と chronic GVHD 様疾患の発症. 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会. 札幌. 日本免疫学会総会・学術集会記録 34: 278, 2004.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
1. 特許取得
該当なし。
 2. 実用新案登録
該当なし。
 3. その他
該当なし。

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

基礎研究分科会研究報告

分担研究者 鈴木和男（分科会会長） 国立感染症研究所・生物活性物質部 室長

研究要旨

基礎研究分科会では、分科会員3名と協力者1名（鈴木和男、土屋尚之、加藤智啓、高橋啓）により施行し、血管炎発症に関する要因の解析を中心に行い3年間の成果を得た。血管炎発症に関する要因として、新たに好中球 CD69 の関与が示唆され、顕微鏡的多発血管炎における HLA および KIR 遺伝子群の関与があり、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。

A. 研究目的

基礎研究分科会では、分科会員3名と協力者1名によって行った。

1. 鈴木和男（分科会会長、国立感染症研究所・生物活性物質部）、高橋 啓（協力研究者、東邦大学医学部大橋病院病理）

2. 土屋尚之（東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学）

3. 加藤智啓（聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター）

以下に3年間の具体的な成果を報告する。

1. 血管炎発症に関する好中球 CD69 の解析

血管炎の発症の要因と病態に、活性化した好中球の影響が考えられている。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、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。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、CD69 分子は好中球の炎症反応に関与している可能性が示唆されている。

これらの研究から、CD69⁺活性化好中球が血管炎発症との関連が示唆されている。本分子は、タイプ₂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いる。

そこで、本研究では、活性化好中球に

CD69 が血管炎発症に関与しているかについて CD69-KO マウスにより解析した。また、血管炎発症にかかわる血栓形成における CD69 の関与についても CD69-KO マウスを用いて検討した。さらに、好中球が活性化されることによって、細胞膜表面に CD69 分子が移行・局在するかに着目し、炎症性サイトカインや走化性因子などで刺激し、*in vitro* における好中球の CD69 分子の細胞膜への表出を、共焦点レーザー顕微鏡、薄層射光照明蛍光顕微鏡を用いてイメージング解析した。

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

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 および DPB1 の検討を行うとともに、あわせて、HLA-class I をリガンドとし、NK 細胞や T 細胞に活性化あるいは抑制性シグナルを伝達する killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR)遺伝子群の関連を検討した。

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

血管炎における抗内皮細胞抗体(AECA)の病因論的役割を明らかにする目的で、その対応抗原同定を行い、個別抗原に対する自己抗体の臨床的意義を明らかにす

る。

B. 研究方法

各分担者の項目を参照

(倫理面への配慮)

患者とはインフォームドコンセントをかわし、個人情報の授受はなく、コードにより解析した。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き行った。

C. 研究結果

<3年間の成果>

1. 血管炎発症に関する好中球 CD69 の解析

CD69-KO マウスにおいて、CAWS(*Candida albicans* water soluble fraction)誘導血管炎の発症頻度が野生型が 100%発症するのに比し、63%に低下した。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。

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。

そこで、*In vitro* において、ヒト末梢血好中球が、細胞内に有する CD69 分子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 で各々単独で刺激して活性化することによって、

CD69 分子が細胞表面に表出するかを、Flowcytometry および共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した結果、CD69 分子が細胞膜周囲に局在することが認められた。さらに、斜光照明蛍光顕微鏡を用いてより高倍率で観察したところ、細胞膜上の CD69 分子の細胞膜局在に偏りが見られた。照明蛍光顕微鏡を用いてイメージング解析した。これらの結果は、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ておこったと推定される。

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 領域では、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。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。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、3 年間

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、顕微鏡的多発血管炎における HLA および KIR 遺伝子群の関与があり、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解析に関する研究
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

本研究は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を行うことを目的とした。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。さらに、

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. Kurokawa MS, Ohoka S, Matsui T, sekine T, Yamamoto K, Nishioka K, Kato T. Expression of MHC class I molecules with antigenic peptides on filamentous phages. *Immunology Letters*, 2002; 80:163-8.
2. Maria Pia Pistillo, Pier Luigi Tazzari, Francesca, Tomohiro Kato, Bonifazi4, Giuseppe Bandini, Roberto Conte, Giovanni Battista Ferrara. Detection of a novel speciality (CTLA-4) in ATG/TMG globulins and sera from ATG-treated leukemia patients. *Transplantation* 2002, 27; 73(8):1295-302.
3. Kurokawa SM, Nishioka K, Kato T. Detection of clonally expanded T cells by RT-PCR-SSCP and nucleotide sequencing of T cell receptor β -CDR3 regions. *RT-PCR protocols in Methods Mol. Biol.* 2002; 193:267-280.
4. Sakata M, Masuko-Hongo K, Tsuruha J, Sekine T, Takigawa M, Nakamura H, Nishioka K, Kato T. YKL-39, a human cartilage-related protein, induces arthritis in mice. *Clin Exp Rheumatol.* 2002; 20(3):343-50.
5. Onuma H, Masuko-Hongo K, Yuan G, Sakata M, iroshi Nakamura H, Kato T, Aoki H, Nishioka K. Expression of the anaphylatoxin receptor C5aR (CD88) by human articular chondrocytes.

Rheumatol Int. 2002; 22(2):52-5.

6. Tsuruha J, Masuko-Hongo K, Kato T, Sakata M, Nakamura H, Sekine T, Takigawa M, Nishioka K. Autoimmunity against YKL-39, a human cartilage-derived protein in patients with osteoarthritis. *J Rheumatol.* 2002 Jul; 29(7):1459-66.
7. Takahama H, Masuko-Hongo K, Tanaka A, Kawa Y, Ohta N, Yamamoto K, Nishioka K, Mizoguchi M, Kato T. T cell clonotypes specific for Dermatophagoides Pteronyssinus in the skin lesion of patients with atopic dermatitis. *Hum Immunol.* 2002; 63(7):558-66.
8. Kojima K, Kurokawa MS, Tanimoto K, Kojima Y, Hara M, Yoshino T, Harada M, Nishioka K, Kato T. Clonal expansion of limited T cell clonotypes in affected muscle from a patient with post-transplant polymyositis. *Bone Marrow Transplant.* 2002; 30:467-70.
9. Okamoto N, Yostuyanagi H, Ohoka S, Matsui T, Kurokawa M, Suzuki M, Iino S, Nishioka K, Kato T. Deetction of autoantibodies to CD69 in patients with chronic hepeticitis type C. *Intervirolgy.* 2003; 46:56-65.
10. Yuan GH, Masuko-Hongo, Kato T, Nishioka K. Immunological intervention in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2003; 48:602-11.
11. Shibakawa A, Aoki H, Masuko-Hongo K, Kato T, Tanaka M, Nishioka K, Nakamura H. Presence of pannus-like tissue on osteoarthritic cartilage and its histological character. *Osteoarthritis Cartilage* 2003; 11:133-40.
12. Ooka S, Matsui T, Nishioka K, Kato T. Autoantibodies to low density lipoprotein receptor-related protein 2 (LRP2) in systemic autoimmune diseases. *Arthritis Res Ther*, 2003; 5:R174-180.
13. Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K. Viral associated arthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 2003; 17:309-318.
14. Sakata M, Masuko-Hongo K, Tsuruha J, Nakamura H, Nishioka K, Kato T. Osteoarthritic articular chondrocytes stimulate T cell responses in vitro. *Clin Exp Rheumatol.* 2003 Nov-Dec; 21(6):704-10.
15. 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.
16. 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.
17. Takata S, Nakamura H, Umemoto S, Yamaguchil 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.
18. 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.
 19. 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)
 20. 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.
 21. 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.
 22. 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)
 23. Kato T, Xiang Y, Nakamura H, Nishioka K. Neo-antigens in oateoarthritis. *Curr Opinion Rheumatol* 2004; 16:604-608.
 24. 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.
 25. 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)
 26. 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.
 27. 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)
 28. Karasawa R, Ozaki S, Nishioka K, Kato T. Autoantibodies to Peroxiredoxin I and IV in patients with systemic autoimmune diseases. *Microbiol Immunol.* (in press)
 29. Masuko-Hongo K, Kato T. Recent developements in treatment of osteoarthritis. *Current Drug Inflammation and Allergy* (in press).
 30. 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)
 31. 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、加藤智啓、西岡久寿樹: 変形性関節症における軟骨細胞とT細胞との自己反応性. 第32回日本免疫学会総会 京王プラザホテル(東京) 12/4-6, 2002
 2. Xiang Y, Sekine T, Nakamura H, Nishioka K, Kato T. Detection of triose phosphate isomerase (TPI) as a specific autoantigen in osteoarthritis. 第32回日本免疫学会総会 京王プラザホテル(東京) 12/4-6, 2002
 3. 加藤智啓、黒川真奈絵、関根太一、松井利浩、西岡久寿樹: RANK (receptor activator of NF-kB)に対する自己抗体. 第32回日本免疫学会総会 京王プラザホテル(東京) 12/4-6, 2002
 4. Kurokaw M, Matsui T, Sekine T, Oooka S, Yamamoto K, Nishioka K, Kato T. Expression of MHC class I molecules together with antigenic peptideson filamentous phages. 第32回日本免疫学会総会 京王プラザホテル(東京) 12/4-6, 2002
 5. Masuko-Hongo K, Kato T, Nakamura H, Nishioka K. Immunological aspects of cartilage degradation in Osteoarthritis. 10th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress (APLAR) Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand 12/1-6, 2002
 6. Du Hui, Chen Shunle, Bao Chunde, Nakamura H, Kato T, Nishioka K.: Community-based epidemiological study on knee osteoarthritis in Huangpu district, Shanghai, China. 10th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress (APLAR) Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand 12/1-6, 2002
 7. Nakamura H, Tanaka M, Shibakawa A, Kato T, Nishioka K. Matrix metalloprotease 1,3,13 nitric oxide and prostaglandin E2 production from OA chondrocytes and synoviocytes stimulated by interleukin-1 β suppressive effects of glucosamine-. 7th World Congress of the OsteoArthritis Research Society International (OARSI) Sydney (Australia) 9/25-28, 2002
 8. Tanaka M, Nakamura H, Shibakawa A, Masuko K,

- Kato T, Nishioka K. T cell-chondrocyte interaction in osteoarthritis. 7th World Congress of the OsteoArthritis Research Society International(OARSI) Sydney (Australia) 9/25-28, 2002
9. Tanaka M, Nakamura H, Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K. Effects of high molecular weight hyaluronan on MMP-1 and RANTES production from chondrocytes. American College of Rheumatology, 66th Annual Scientific Meeting New Orleans, Louisiana 10/24-29, 2002
 10. Zhou J, Nakamura H, Yuan GH, Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K. Regulatory effects of CC chemokines on the expression of TNF and TGF receptors in chondrocytes. American College of Rheumatology, 66th Annual Scientific Meeting New Orleans, Louisiana 10/24-29, 2002
 11. Kojime K, Kurokawa MS, Tanimoto K, Kojima Y, Yoshino T, Harada M, Tanimoto M, Nishioka K, Kato T. Clonal expansion of limited T cell clonotypes in affected muscle from a patient with post-transplant polymyositis. American College of Rheumatology, 66th Annual Scientific Meeting New Orleans, Louisiana 10/24-29, 2002
 12. Kurokawa MS, Matsui T, Sekine T, Ohoka S, Yamamoto K, Nishioka K, Kato T. Expression of MHC class I molecules together with antigenic peptides on filamentous phages. American College of Rheumatology, 66th Annual Scientific Meeting New Orleans, Louisiana 10/24-29, 2002
 13. Shibakawa A, Nakamura H, Tanaka M, Yuan G, Kato T, Nishioka K. Pannus-like soft tissue on the surface of osteoarthritic cartilage and its function. American College of Rheumatology, 66th Annual Scientific Meeting New Orleans, Louisiana 10/24-29, 2002
 14. Tanaka M, Nakamura H, Shibakawa A, Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K. Direct contact of chondrocytes and autologous T cells enhances chemokines and MMPs productions in osteoarthritis. American College of Rheumatology, 66th Annual Scientific Meeting New Orleans, Louisiana 10/24-29, 2002
 15. 加藤智啓, 中村洋, 西岡久寿樹: 変形性関節症における免疫学的機序. 第46回日本リウマチ学会 神戸国際会議場(神戸) 4/22-24, 2002
 16. 関根太一, 加藤智啓, 西岡久寿樹: HTLV-I 陰性慢性関節リウマチ患者における HTLV-I tax に対する抗体の検出. 第46回日本リウマチ学会 神戸国際会議場(神戸) 4/22-24, 2002
 17. Xiang Y, Sekine T, Nakamura H, Nishioka K, Kato T. Comprehensive analysis of autoantigens related to chondrocytes in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. 第46回日本リウマチ学会 神戸国際会議場(神戸) 4/22-24, 2002
 18. Wei J, Yuan GH, Nakamura H, Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K.: Detection of soluble CC chemokine receptor CCR5 in serum from patients with rheumatoid arthritis. 第46回日本リウマチ学会 神戸国際会議場(神戸) 4/22-24, 2002
 19. Yao Z, Kato T, Kurokawa M, Masuko-Hongo K, Tsuruha J, Nakamura H, Nishioka K.: Mapping of arthritogenic epitopes of cartilage intermediate layer protein. 第46回日本リウマチ学会 神戸国際会議場(神戸) 4/22-24, 2002
 20. 中村洋, 増子佳世, 加藤智啓, 西岡久寿樹: ヒト軟骨細胞の PGE2, NO, MMP, TIMP 産生に対するグルコサミンの効果. 第46回日本リウマチ学会 神戸国際会議場(神戸) 4/22-24, 2002
 21. 田中道明, 中村洋, 増子佳世, 加藤智啓, 西岡久寿樹: ヒト軟骨細胞の MMP-I および RANTES 産生に及ぼすヒアルロン酸の作用. 第46回日本リウマチ学会 神戸国際会議場(神戸) 4/22-24, 2002
 22. 田中道明, 中村洋, 芝川温之, 増子佳世, 加藤智啓, 西岡久寿樹: 変形性関節症患者の軟骨細胞と T 細胞の反応. 第46回日本リウマチ学会 神戸国際会議場(神戸) 4/22-24, 2002
 23. Yuan GH, Masuko-Hongo K, Nakamura H, Shibakawa A, Kato T, Nishioka K.: Identification and function of novel cells: chondrofibroblasts in patients with osteoarthritis. 第46回日本リウマチ学会 神戸国際会議場(神戸) 4/22-24, 2002
 24. 芝川温之, 中村洋, Yuan GH, 田中道明, 加藤智啓, 西岡久寿樹: 変形性関節症軟骨における Pannus 様組織に関する組織学的検討. 第46回日本リウマチ学会 神戸国際会議場(神戸) 4/22-24, 2002
 25. 黒川真奈絵, 西岡久寿樹, 加藤智啓: 全身性強皮症患者の末梢血および皮膚浸潤 T 細胞クロナリティーの解析. 第46回日本リウマチ学会 神戸国際会議場(神戸) 4/22-24, 2002
 26. 中村浩士, 高田智子, 加藤智啓, 西岡久寿樹, 松崎益徳: ウイルス性心筋炎再感染モデルにおける抗心筋抗体の検討. 第46回日本リウマチ学会 神戸国際会議場(神戸) 4/22-24, 2002
 27. 大岡正道, 松井利浩, 西岡久寿樹, 加藤智啓: 全身性自己免疫疾患における LDL-receptor related protein 2 に対する自己抗体の検討. 第46回日本リウマチ学会 神戸国際会議場(神戸) 4/22-24, 2002
 28. 荻谷卓昭, 林和彦, 与那嶺京子, 田口泰之, 石塚文平, 増子佳世, 加藤智啓: T cell clone level の変化からみた習慣流産患者夫リンパ球免疫療法の効果. 第54回日本産科婦人科学会総会 ホテルメリディアン(東京) 4/6-9, 2002
 29. 田中道明, 中村洋, 増子-本郷佳世, 加藤智啓, 西岡久寿樹: 軟骨細胞の MMP-1 および RANTES 産生に対する高分子ヒアルロン酸の作用検討. 第1回 Biomatrix Forum 研究発表会 パレスホテル(東京) 1/26, 2002
 30. 加藤智啓: 変形性関節症の免疫学的機序. ハイテク・リサーチ・センターフォーラム2002 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター 1/22, 2002
 31. 加藤智啓, 大岡正道, 関根太一, 尾崎承一, 西村裕之, 三井健一, 西岡久寿樹: 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. 第33回日本免疫学会総会 福岡国際会議

- 場、マリンメッセ福岡(福岡) 12/8-10, 2003
32. Kato T, Dai S-M, Yao Z, Watanabe A, Ooka S, Kurokawa MS, Nakamura H, Matsui T, Nishioka K.: Inhibition of Osteoclastogenesis by Autoantibodies to RANK in vitro. American College of Rheumatology, 67th Annual Scientific Meeting Orlando, Florida 10/23-28, 2003
 33. Xiang Y, Sekine T, Nakamura H, Imajoh-Ohmi S, Fukuda H, Nishioka K, Kato T.: Fibulin-4 is a Component of Cartilage and a Target of Autoantibodies in Osteoarthritis and Rheumatoid Arthritis. American College of Rheumatology, 67th Annual Scientific Meeting Orlando, Florida 10/23-28, 2003
 34. Xiang Y, Sekine T, Nakamura H, Imajoh-Ohmi S, Fukuda H, Nishioka K, Kato T.: Proteomic Surveillance of Autoimmunity in Osteoarthritis: Identification of Triosephosphate Isomerase as an Autoantigen in Patients with Osteoarthritis. American College of Rheumatology, 67th Annual Scientific Meeting Orlando, Florida 10/23-28, 2003
 35. Karasawa R, Sekine T, Ooka S, 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, 67th Annual Scientific Meeting Orlando, Florida 10/23-28, 2003
 36. 中村洋、田中道明、増子佳代、加藤智啓、西岡久寿樹: 変形性関節症における免疫機構 - 軟骨細胞とT細胞の相互作用について - 第18回日本整形外科学会基礎学術集会 北九州国際会議場(北九州市) 10/16-17, 2003
 37. Kato T, Xiang Y, Sekine T, Nakamura H, Imajoh-Ohmi S, Fukuda H, Nishioka K.: Proteomic surveillance of autoimmunity in osteoarthritis. 3rd World Congress of the Global Arthritis Research Network (GARN) Miyazaki, Japan (Summit Hall at Sheraton Resorts) 9/14-17, 2003
 38. Masuko-Hongo K, Shang ZZ, Kato T, Nakamura H, Nishioka K.: 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 induces apoptosis in human articular chondrocytes. 3rd World Congress of the Global Arthritis Research Network (GARN) Miyazaki, Japan (Summit Hall at Sheraton Resorts) 9/14-17, 2003
 39. Nakamura H, Kato T, Masuko-Hongo K, Tanaka M, Shibakawa A, Nishioka K.: T cell-chondrocyte interaction in the pathogenesis of osteoarthritis. 3rd World Congress of the Global Arthritis Research Network (GARN) Miyazaki, Japan (Summit Hall at Sheraton Resorts) 9/14-17, 2003
 40. Nakamura H, Hoshi K, Kato T, Ozaki S, Nishioka M, Nishioka K.: Clinical feature of fibromyalgia syndrome in Japan and novel strategy in the treatment by bioproduct (Neurotoropin).. 3rd World Congress of the Global Arthritis Research Network (GARN) Miyazaki, Japan (Summit Hall at Sheraton Resorts) 9/14-17, 2003
 41. Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K.: Immunoreaction-mediated pathway of cartilage degradation in osteoarthritis. Annual Euroean Congress of Rheumatology (EULAR) Lisbon, Portugal 6/18-21, 2003
 42. Xiang Y, Sekine T, Nakamura H, Imajoh-Ohmi S, Fukuda H, Nishioka K, Kato T.: Proteomic surveillance of autoimmunity in osteoarthritis: identification of triosephosphate isomerase as an autoantigen in patients with osteoarthritis. Annual Euroean Congress of Rheumatology (EULAR) Lisbon, Portugal 6/18-21, 2003
 43. Kato T, Dai SM, Matsui T, Suzuki-Kurokawa M, Ooka S, Nishioka K.: Autoantibodies (autoAbs) to receptor-activator of NF-kB (RANK). 第47回日本リウマチ学会総会 京王プラザホテル(東京) 4/24-26, 2003
 44. 増子佳世、加藤智啓、中村洋、西岡久寿樹: 免疫学的機序を介する軟骨細胞の変性過程について. 第47回日本リウマチ学会総会 京王プラザホテル(東京) 4/24-26, 2003
 45. 田中道明、中村洋、増子佳世、加藤智啓、西岡久寿樹: ヒト軟骨細胞に対するヒアルロン酸の異化抑制効果と分子量について. 第47回日本リウマチ学会総会 京王プラザホテル(東京) 4/24-26, 2003
 46. 唐沢里江、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関する検討. 第47回日本リウマチ学会総会 京王プラザホテル(東京) 4/24-26, 2003
 47. 芝川温之、中村洋、袁国華、田中道明、加藤智啓、別府諸兄、青木治人、西岡久寿樹: 変形性関節症の病態形成におけるパンヌス様組織について. 第47回日本リウマチ学会総会 京王プラザホテル(東京) 4/24-26, 2003
 48. Du H, Kato T, Xiang Y, Masuko K, Nakamura H, Chen SL, Nishioka K.: Detection of Autoantibodies to Cartilage Intermediate Layer Protein in Shanghai Knee Osteoarthritis Patients. 第47回日本リウマチ学会総会 京王プラザホテル(東京) 4/24-26, 2003
 49. Xiang Y, Sekine T, Nakamura H, Nishioka K, Kato T.: Proteomic surveillance of autoantigen(autoAg)s: Identification of fibulin-4 as an autoAg in osteoarthritis. 第47回日本リウマチ学会総会 京王プラザホテル(東京) 4/24-26, 2003
 50. Xiang Y, Sekine T, Nakamura H, Nishioka K, Kato T.: Proteomic surveillance of autoantigen(autoAg)s: Identification of triose phosphate isomerase as an autoAg in osteoarthritis. 第47回日本リウマチ学会総会 京王プラザホテル(東京) 4/24-26, 2003
 51. 関根太一、中村洋、西岡久寿樹、加藤智啓: 変性製関節症患者軟骨細胞のプロテオーム変化に対するIL-1の影響の解析. 第47回日本リウマチ学会総会 京王プラザホテル(東京) 4/24-26, 2003
 52. 中村洋、田中道明、増子佳世、加藤智啓、西岡久

- 寿樹: T/C28a2 ヒト軟骨細胞株 MMP-1 発現に対するヒアルロン酸の効果. 第 47 回日本リウマチ学会総会 京王プラザホテル(東京) 4/24-26, 2003
53. 田中道明、中村洋、増子佳世、加藤智啓、西岡久寿樹: 軟骨細胞と自己末梢血 T 細胞の相互作用に対するヒアルロン酸の作用. 第 47 回日本リウマチ学会総会 京王プラザホテル(東京) 4/24-26, 2003
 54. 黒川真奈絵、西岡久寿樹、加藤智啓: 骨髄移植後筋炎における T 細胞クロナリティーの解析. 第 47 回日本リウマチ学会総会 京王プラザホテル(東京) 4/24-26, 2003
 55. 大岡正道、松井利浩、西岡久寿樹、加藤智啓: 全身性自己免疫疾患患者における CDw150(SLAM) に対する自己抗体. 第 47 回日本リウマチ学会総会 京王プラザホテル(東京) 4/24-26, 2003
 56. 中野弘雅、大岡正道、松田隆秀、関根太一、尾崎承一、西岡久寿樹、加藤智啓: ベーチェット病における自己抗体の検索: 抗 cofilin 抗体の同定. 第 47 回日本リウマチ学会総会 京王プラザホテル(東京) 4/24-26, 2003
 57. 中村浩士、高田智子、三浦俊郎、加藤智啓、西岡久寿樹、松崎益徳: ウイルス性心筋炎再感染モデルにおける自己抗体の検討. 第 47 回日本リウマチ学会総会 京王プラザホテル(東京) 4/24-26, 2003
 58. 加藤智啓: 変形性関節症における自己抗原の網羅的探索と解析. 第 1 回ヒトプロテオーム学会 つくば産業技術総合研究所共用講堂 2/13-14, 2003
 59. 加藤智啓: プロテオームファクトリーからみた関節破壊の分子機構と標的分子. 厚生労働省厚生科学研究公開シンポジウム 全社協・灘尾ホール(東京) 1/23, 2003
 60. 加藤智啓: 変形性関節症と自己免疫. ハイテク・リサーチ・センターフォーラム 2002 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター 1/21, 2003
 61. 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
 62. 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
 63. 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: ペルオキシルレドキシン 2 に対する自己抗体. 平成 15 年度第 2 回 厚生労働省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
 64. 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
 65. 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
 66. 松尾光祐、中村洋、野寄浩司、齋藤知行、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
 67. 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
 68. 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
 69. 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
 70. 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
 71. 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
 72. 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
 73. 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
 74. 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
 75. 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
 76. 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検索. 第22回日本骨代謝学会 グランキューブ大阪 8/4-7, 2004
77. 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
 78. 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
 79. 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
 80. 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
 81. 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
 82. 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
 83. 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
 84. 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
 85. 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
 86. 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
 87. 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
 88. 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
 89. 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
 90. 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
 91. 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
 92. 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
93. 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
94. 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
95. 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
96. 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
97. 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
98. 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.
99. 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
血管炎抗原ペプチドと血管炎診断方法
 2. 実用新案登録
なし。
 3. その他
なし。

血管炎発症機構に關与する 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

3年間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 の關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 分子の關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關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關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 分子が炎症反應に關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₁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、本研究では、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。また、好中球の活性化これらの現象が、活性化好中球での CD69 の挙動に依存している可能性が大きいことから、炎症性サイトカインや走化性因子で好中球を刺激して活性化させ、CD69 分子の細胞膜表面への移行・局在について共焦点レーザー顕微鏡、斜光照明蛍光顕微鏡を用いてイメージング解析した。

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。

2. 斜光照明蛍光顕微鏡での観察

ヒトおよびマウス末梢血から比重分離法によって好中球を分離し、スライドグラス上に直径 7 mm 孔ラバープレート張り付けた well に、好中球を 37°C、10min で粘着させた。その後、PMA(100ng/ml)、fMet-Leu-Phe(1 μM)を well に添加し、37°C、10min で加温した。刺激後、直ちに 1% パラホルムアルデヒドで固定し、FITC 標識抗 CD69 抗体で染色して観察した。また、斜光照明蛍光顕微鏡での観察時は、刺激した細胞を固定せずに抗体を添加し、経時的に局在変化を観察した。

(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

<3 年間の成果>

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。

3. 斜光照明蛍光顕微鏡による CD69 分子の好中球細胞膜局在解析

そこで、*in vitro* において、ヒト末梢血好中球による CD69 分子の好中球細胞膜局在を解析した。PMA を対照とし、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 で各々単独で刺激した。刺激した細胞を Flowcytometry および共焦点レーザー顕

微鏡を用いて観察した結果、CD69 分子が細胞膜周囲に局在したことが認められた。さらに、斜光照明蛍光顕微鏡を用いて、生きた好中球のまま、高倍率で観察したところ、PBS 対象ではみられない細胞膜上の CD69 分子が 40 秒ですでに細胞膜に局在していた。斜明蛍光顕微鏡を用いてイメージング解析した。これらの結果は、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ておこったと推定される。

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、好中球の炎症反応の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、3年間の成果を得た。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

2002年度

1. Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., Dinuer, M.C., Maeda, N., and Koyama, H.: Critical role of myeloperoxidase and nicotianamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase in high-burden systemic infection of mice with *Candida albicans*. *J. Infect. Dis.* 185, 1833-1837, 2002.
2. Vilhardt, F., Plastre, O., Sawada, M., Suzuki, K., Wiznerowicz, M., Kiyokawa, E., Trono, D. and Krause, KH.: The HIV-1 Nef protein and phagocyte NADPH oxidase activation. *J Biol Chem* 277, 42136-43, 2002.
3. Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., Dinuer, M.C., Maeda, N. and Koyama, H.: Relative contributions of myeloperoxidase and NADPH-oxidase to the early host defense against pulmonary infections with *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*.