

免疫グロブリン大量静注療法の作用機序解明と新しい治療標的分子の探索

所属 国立成育医療センター研究所 免疫アレルギー研究部
研究者 阿部 淳

研究要旨 免疫グロブリン大量静注療法の作用機序を明らかにすることを目的として、川崎病患者末梢血における遺伝子発現プロファイルの変化を解析した。また急性期患者血清による血管内皮細胞機能の障害作用について解析した。同療法によるモノサイトの多彩な機能抑制、および血管内皮細胞機能の回復が証明された。

分担研究者

- (1) 千葉大学大学院医学研究院小児病態学
寺井 勝
- (2) 株式会社ベネシス研究開発本部 平尾 豊

A. 研究目的

免疫グロブリンは感染症のみならず種々の疾患、病態の治療薬として用いられている。免疫グロブリンの病原微生物感染における防御作用の機序として考えられる経路には、(1)細菌、ウイルスの増殖に対する特異抗体を通じた中和作用、

(2)細菌、ウイルスが産生する毒素に対する特異抗体を通じた中和作用、(3)抗原抗体複合体を形成することによる貪食殺菌能の増強(オプソニン効果)、(4)同じく抗原抗体複合体を形成することによる抗体依存性細胞障害活性の増強、などがあげられる。一方、静注用免疫グロブリン製剤が普及して比較的大量の免疫グロブリンを経静脈的に投与することが可能になった結果、このような感染症以外の分野でも、とくに自己免疫性疾患を中心として、免疫グロブリンのもつ種々の免疫修飾作用を期待した治療法が試みられるようになった。これらの治療の理論的根拠としては、

(1)免疫グロブリンのFc部分がマクロファージのFc受容体をブロックする、(2)マクロファージやリンパ球の抑制型Fc受容体に結合してその活性化をおさえる、(3)活性化された血清中の補体が非特異的に細胞傷害を起こすをおさえる、(4)自己抗体に対する抗イディオタイプ抗体としてはたらく、などがあげられてきた。現在、特発性血小板減少性紫斑病、川崎病、ギラン・バレー症候群の3疾患に対して、免疫グロブリン大量静注療法(IVIG療法)の臨床効果が確認され保険適用が承認されているが、各々の疾患における免疫グロブリンの作用機序は必ずしも明らかではない。

川崎病は、乳幼児に好発する原因不明の全身性血管炎である。川崎病における免疫グロブリン大量静注療法の目的は、“急性期の強い炎症反応を可能な限り早期に終息させ、結果として合併症である冠動脈瘤の発症頻度を最小限にすること”

(川崎病急性期治療のガイドライン、日本小児循環器学会学術委員会、2003)である。実際に、川崎病急性期治療におけるIVIG療法の有効性は確立しており、冠動脈瘤の発生率の低下が報告されている。しかしIVIG療法の作用機序には未だ不明の部分が多く、治療抵抗例も少なからず存在する。これらの治療抵抗例から冠動脈瘤の発生する頻度が高いこと、抵抗例に対して用いられるステロイド療法や免疫抑制剤の使用根拠も明らかではないことから、IVIG療法の作用機序の解明が早急に求められている。

本研究では、川崎病におけるIVIG療法の治療標的分子を同定して、その作用機序を明らかにするために、(1)免疫グロブリン大量静注療法前後での川崎病患者の末梢血中の免疫細胞の遺伝子発現プロファイルをDNAマイクロアレイで解析する、(2)発現が有意に変動した遺伝子を抽出し、蛋白レベルでの発現量を確認した上で、(3)これらの蛋白の発現量変化が川崎病患者の臨床経過に及ぼす影響について解析する、さらに(4)これらの蛋白の産生制御における免疫グロブリンの役割についてインビトロで解析する、また(5)川崎病初期にみられる血管透過性の著名な亢進に対する免疫グロブリンの作用について解析する、以上の5点を目的とした。

B. 研究方法

(1) 検体の採取およびマイクロアレイ解析

川崎病急性期の患者から、免疫グロブリン療法の開始前と投与後間もない時期にヘパリン加静脈血を採取した。遠心分離により単核球(PBMC)を、ネガティブセレクションによりモノサイトと

T細胞を各々精製し、各分画からRNAを抽出して遺伝子発現プロファイルの解析を行った。解析には、Affymetrix社のGeneChip[™] (HG-U133A) およびSilicon Genetics社の解析ソフトGeneSpring[™]を用いた(研究協力者: 斎藤博久、国立成育医療センター研究所 免疫アレルギー研究部長)。

(2) マイクロアレイ解析の確認

マイクロアレイ解析において有意に発現の変動した遺伝子群を抽出し、リアルタイム RT-PCR、フローサイトメトリー、ELISAなどを用いて mRNA 発現量および蛋白発現量の変動を確認した。

(3) IgG 標品の精製

市販の静注用 intact IgG 溶液を透析処理して蒸留水に置換した後、限外ろ過膜 (50,000MW) を用いて遠心分離濃縮を行い、IgG20%濃度とした。標品の精製度は HPLC ゲルろ過分析により確認した。リムルス試験による標品への LPS の混入は 50pg/ml 以下だった。

(4) 細胞培養

健常成人の末梢血から分離した PBMC および精製モノサイト、あるいは THP-1 細胞株は、24 well プレートに分注して 0.1-1000ng/ml の LPS で刺激し、10%FCS 加 RPMI1640 培養液中で培養した。一部の培養液には 1-30mg/ml の精製 IgG を添加した。

(5) mRNA の定量

S100A8、S100A9、S100A12、IL-6、IL-10、および GAPDH の mRNA の定量は、TaqMan プローブを用いたリアルタイム RT-PCR 法により行った。各々の塩基配列特異的プロローブは、GenBank データベースの塩基配列を基に、PrimerExpress[™]ソフトウェアを用いて設計した。

(6) 川崎病患者血清

過去5年の間に川崎病と診断され、千葉大学病院で入院加療を行った患者、22例、40検体の凍結血清を使用した。22例中、10例が免疫グロブリン療法 (IVIG) 反応例、12例が IVIG 不応例である。

(7) 培養ヒト臍帯静脈血管内皮細胞

培養ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC、Clonetics 社) は全ての実験において passage. 2~4 のものを使用した。

(8) インビトロ HUVEC 管腔形成能実験

マトリゲルでコートしたプレート上に HUVEC を播種、18時間培養した。マトリゲル上に HUVEC を培養する際、健常あるいは川崎病患者血清や薬剤の添加を行った。形成された血管長の合計を画像解析にて計算、定量評価した。全ての実験において同一の健常成人血清を標準血清とし

て用い、この血清によって形成された血管長を 100%として算出した。

(9) インビトロ HUVEC 透過性実験

HUVEC をトランスウェルの上層に播種し、confluent の状態に培養を行った。FITC-dextran を upper chamber に加え、leak の有無を確認した後、upper chamber 内に患者血清や血管透過性刺激物質を添加、2時間培養した。lower chamber に漏れ出した FITC dextran を蛍光吸光度計にて測定し、透過率を算出した。インビトロ管腔形成能実験同様、全ての実験で標準血清を用い、この血清による HUVEC 透過率を 100%として算出した。

(10) HUVEC 内のタンパク発現量の検討

健常者あるいは病期の異なる川崎病患者血清の存在下によって変動する HUVEC 内のタンパク発現量を、ウェスタンブロット法にて解析した。

(倫理面への配慮)

臨床検体を用いる遺伝子発現プロファイル解析の研究計画については国立成育医療センターの倫理審査を受け承認された。また臨床検体の採取および臨床情報の提供に当たっては、研究協力者の所属する各機関における倫理委員会の承認を得た。川崎病患者および健常者の血清の採取ならびに研究計画については千葉大学大学院医学研究院の倫理審査委員会の承認を得た。本研究の目的及び医学的貢献について代諾者に十分に説明した上で、各所属機関における倫理規定に合わせて検体採取の同意を得た。また検体情報を記号化することにより、患者名などの個人情報が出ないように配慮した。

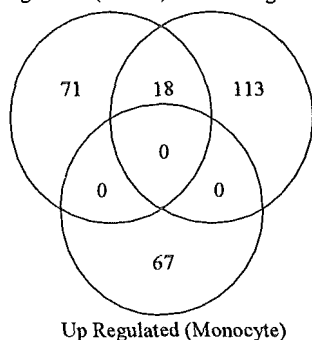
C. 研究結果

(1) 遺伝子発現プロファイル解析結果:

末梢血単核球 (PBMC) を対象とした遺伝子発現解析では、免疫グロブリン療法によって有意に発現が変動したプロローブが 509 個見出された。このうち、免疫グロブリン療法後に 2 倍以下に発現が低下したものが 85 個、2 倍以上に増加したものが 4 個だった。さらに末梢血から精製されたモノサイトを対象とした遺伝子発現解析では、免疫グロブリン療法後に有意に発現が 2 倍以下に低下した遺伝子が 131 個、2 倍以上に増加した遺伝子が 67 個見出された。

PBMC とモノサイトの解析を総合した結果、18 個の遺伝子が、IVIG 療法により両方のサブセットにおいて抑制的に制御されたことが明らかになったため、これら 18 個の遺伝子を集中的に解析した (下図)。

Up/Down Regulated (PBMC) Down Regulated (Monocyte)



(2) DNAマイクロアレイ解析の確認：

末梢血から精製したモノサイトおよびT細胞からRNAを抽出して、リアルタイムRT-PCRによりmRNA量の変動について解析した。その結果、細胞外に分泌されて血管拡張作用を示すADMや血管内皮細胞に働いて炎症惹起作用を示すS100A8、S100A9、S100A12などのS100カルシウム結合蛋白ファミリー、さらにFCGR1A、FCGR3A、CCR2などの細胞表面受容体の遺伝子の発現量が、IVIG療法後のモノサイトで有意に低下することが確認された。同時に測定したTNF- α 、IL-6、IL-8などの炎症性サイトカイン・ケモカインの遺伝子の発現量は、IVIG療法後も有意な低下はみられなかった。

(3) FCGR1A、FCGR3Aの蛋白発現の解析：

モノサイトでmRNAの発現が有意に低下することが確認された遺伝子の中からFCGR1A、FCGR3Aの2つの活性型Fcガンマレセプターについて、フローサイトメトリーを用いて蛋白レベルでの発現量の変動を解析した。その結果、FCGR1A、FCGR3Aともに、IVIG療法後にCD14陽性モノサイトの細胞膜上での発現が有意に低下していることが確認された。同時に測定したFCGR 2A/Bの発現量はIVIG療法前後で有意の変動はみられなかった。

(4) S100カルシウム結合蛋白の血中濃度：

モノサイトで有意に発現が低下することが確認されたS100カルシウム結合蛋白ファミリー遺伝子の中から、S100A9ホモダイマーとS100A8/A9ヘテロダイマーの患者血漿中の濃度をELISAで定量した。その結果、S100A8/A9ヘテロダイマーの血漿中濃度は、急性期の川崎病患者で他の熱性疾患対照患者と比べて有意に上昇していること、またIVIG療法後に有意に低下することが見出された。S100A9ホモダイマーの血漿中濃度は、ヘテロダイマーとは逆にIVIG療法後に有意に上昇することが明らかになったが、他の熱性疾患対照患者との有意差はみられなかった。

(5) THP-1 細胞株、PBMC および精製モノサイトによる S100A8、S100A9、S100A12 の mRNA の産生：

THP-1細胞株をLPSで刺激培養すると0.1ng/mlから1000ng/mlの範囲で用量依存性にS100A8、S100A9、S100A12のmRNA産生が亢進した。しかし、LPS刺激の2時間前から精製IgG (1-30mg/ml) を添加しても、S100A8、S100A9、S100A12のmRNA産生亢進は抑制されなかった。

PBMCをLPSで刺激培養すると、THP-1と同様に0.1ng/mlから1000ng/mlの範囲で用量依存性に24時間後をピークとするS100A8、S100A9、S100A12のmRNA産生の亢進が認められた。THP-1とは異なり、LPS刺激の0-2時間前から精製IgG (1-30mg/ml) を添加することにより、LPS刺激によるS100A8、S100A9、S100A12のmRNA産生亢進はIgGの用量依存性に抑制された。同様のIgG添加によるmRNA産生亢進の抑制は、精製モノサイトを用いた実験でも確認された。

(6) PBMC における S100A8、S100A9、S100A12、S100A8/A9 蛋白の発現：

PBMCでのS100蛋白の産生制御について調べるために、S100A8、S100A9、S100A12、S100A8/A9の各蛋白に対する特異抗体を用いて細胞内免疫染色を行い、フローサイトメトリーで解析した。S100A8、S100A12については有意な染色が認められなかったが、S100A9はモノサイトの約60%が陽性、S100A8/A9ヘテロダイマーはモノサイトの約85%が陽性だった。LPS 100ng/mlで刺激培養すると、1時間後にS100A9、S100A8/A9ヘテロダイマーともに陽性率は16%、60%に著減した。

(7) 川崎病患者血清による HUVEC 管腔形成能：

HUVEC 管腔形成能への影響は、IVIG療法に不応だった患者血清でのみ認められ、健常小児ならびに有熱疾患対照血清、IVIG療法に反応した患者血清では有意差を認めなかった。さらに、初回IVIG療法後の患者血清を添加すると、対照血清のみならずIVIG反応例のIVIG療法後血清と比べても、HUVEC管腔形成能の有意な低下がみられた(下図参照)。



a. 血清無添加
b. 健常小児例
c. IVIG反応例 IVIG治療前
d. IVIG反応例 IVIG療法後
e. IVIG不応例 IVIG治療前
f. IVIG不応例 IVIG療法後

(8) 川崎病患者血清により誘導される HUVEC 透過率の亢進：

IVIG 療法反応例では、同療法前後の血清による HUVEC 透過率への影響は健常小児例の対照血清による影響と有意差を認めなかった。しかし IVIG 不応例の IVIG 療法後血清を添加すると、HUVEC 透過率は健常小児例ならびに有熱疾患例の対照血清添加時と比べて、有意に亢進した ($p < 0.005$)。

(9) 免疫グロブリンによる HUVEC 管腔形成能および HUVEC 透過性への影響：

血管内皮細胞に対する IVIG の直接的な作用を検討する為に、HUVEC 管腔形成能ならびに HUVEC 透過性への IVIG 添加の影響を検討した。HUVEC 管腔形成能実験では、IVIG 100 μ g/mL 以上の濃度を添加することによって、IVIG 無添加と比べ有意に HUVEC 管腔形成能が亢進した。また、HUVEC 透過性実験では、IVIG 1000 μ g/mL の濃度を添加することによって、IVIG 無添加と比べて HUVEC 透過率が抑制された。

(10) HUVEC における活性化 p38 MAPK の発現：

川崎病患者血清存在下での HUVEC における活性化 p38 MAPK の発現についてウェスタンブロット法を用いて検討した。治療前血清にて刺激した HUVEC では、活性化 p38 MAPK が強く発現していた。IVIG 反応例の IVIG 療法後の血清で刺激した HUVEC では、活性化 p38 MAPK の発現量は減少したが、IVIG 不応例の初回 IVIG 療法後の血清で刺激した HUVEC の p38 MAPK の活性化は持続していた。

D. 考察

IVIG 療法の作用機序として様々な仮説が提唱されてきたが、その内容は適応となる疾患ごとに異なっている。免疫グロブリンのような多様な生理活性をもつ生物製剤の治療ターゲットを同定するためには、遺伝子発現プロファイル解析のような網羅的アプローチが適していると考えられる。本研究では、川崎病患者を対象として、急性期の末梢血中の免疫細胞における遺伝子発現プロファイルを IVIG 療法の前後で比較することによって、川崎病における IVIG 療法の作用機序を明らかにし、治療効果の早期判定や治療抵抗症例に対する代替治療の根拠となる指標を提出することを目標のひとつとした。

初年度にあたって、まず川崎病患者の末梢血単核球 (PBMC) から、次に精製モノサイトから抽出した RNA を用いて、遺伝子発現プロファイルを解析した。研究結果の項に示した通り、IVIG 療法

の前後で有意に変動する遺伝子群が多数見出されたことは、本研究のような網羅的アプローチが有効であることを示すと同時に、免疫グロブリンの大量静注が実際に多彩な生理活性を誘導することを証明するものである。

今回の結果でとくに注目すべきことは、PBMC における遺伝子発現が IVIG 療法の前後で 2 倍以上変動した 89 個の遺伝子のうち、実に 84 個の遺伝子が抑制的に制御されていた点である。これらの遺伝子の機能は、細胞表面に発現して細胞外からのシグナル受容体として働くもの、糖・脂質代謝における酵素として働くもの、細胞外に分泌される生理活性蛋白、転写調節因子など多岐にわたっていた。特徴的なことは、多くの遺伝子が主としてモノサイトで発現され、モノサイトの機能において重要な役割を担うものであった点である。実際に、精製モノサイトを用いた遺伝子発現プロファイル解析では、PBMC を上回る数の遺伝子発現が IVIG 療法の前後で有意に変動した。

今年度はこれらの遺伝子の中から、PBMC と精製モノサイトの両方の実験で共通に、IVIG 療法後の発現が低下した遺伝子に注目して解析を進めた。抽出された 18 個の遺伝子のなかには、FCGR1A、FCGR3A の 2 つの活性型免疫グロブリン受容体をはじめとして、モノサイトに働くケモカイン MCP-1 の受容体である CCR2、モノサイトから分泌されて血管拡張作用を示す ADM や炎症惹起作用を示す S100A9、S100A12 などの S100 カルシウム結合蛋白ファミリーなど、興味深い機能分子が含まれていた。このうち FCGR1A、FCGR3A、S100A9 の 3 つの遺伝子について、今回川崎病患者では初めて、蛋白レベルでの IVIG 療法後の発現抑制を証明した。中でも S100A8/A9 ヘテロダイマーの血漿中濃度は、他の熱性疾患対照患者と比べても急性期の川崎病患者で有意に高く、IVIG 療法後に急速に低下する点が注目された。

培養細胞を用いたインビトロの実験系では、S100A8、S100A9、S100A12、S100A8/A9 ヘテロダイマーの産生調節について、基礎的な検討を行った。THP-1 細胞株、PBMC、精製モノサイトともに恒常的に S100A8、S100A9、S100A12 の mRNA を産生しており、その産生量は LPS 刺激によって用量依存的に増加した。しかし PBMC および精製モノサイトでは IVIG 療法後に生理的にみられる濃度 (20-30mg/ml) の IgG の添加で、LPS 刺激後の S100A8、S100A9、S100A12 の mRNA 産生亢進が抑制されたのに対して、THP-1 細胞株では同濃度の IgG による抑制はほとんどみられなかった。この理由は不明だが、THP-1 細胞株の分化段階、とくに Fc γ レセプターの発現の程度が関連するのでは

ないかと推察された。また PBMC および精製モノサイトでは、同濃度の IgG の添加によって LPS 刺激後の IL-6 および IL-10 の mRNA の産生亢進も抑制されており、IgG 添加による S100A9、S100A12 の mRNA 産生抑制が、モノサイトへの直接作用なのか、または IL-6、IL-10 などの産生抑制を介した二次的作用なのかについて、さらに検討する必要がある。

また、急性期川崎病患者の IVIG 療法前後の血清が培養 HUVEC の管腔形成能と透過性機能に与える影響について解析したところ、興味深い結果が得られた。HUVEC 管腔形成能の障害と HUVEC 透過性機能の亢進とが、ともに IVIG 療法に不応だった患者血清で有意に強くみられたことは、IVIG 不応例の臨床像、すなわち、全身性浮腫が強く、低アルブミン血症を呈し、冠動脈病変を来し易いことと一致している。また、IVIG 療法に反応した患者血清では HUVEC における p38 MAPK 活性化が抑制されたのに対して IVIG 療法に不応だった患者血清では p38 MAPK 活性化が抑制されなかった。以上のことは、IVIG 療法不応例では、同療法による炎症性サイトカインの産生抑制が不十分であり、その結果としてこれらのサイトカインによる血管内皮細胞での p38 MAPK の活性化と透過性機能の亢進が生じていることを示すものかもしれない。IVIG 不応患者血清によって惹起される HUVEC の機能障害は、IVIG 治療前より治療後の血清によるものの方が強かったが、高濃度の IgG 添加が HUVEC の機能障害にどのように影響するのか、さらにインビトロ実験で検討する必要があると考えられた。

E. 結論

川崎病の急性期には、免疫グロブリン療法の前後で発現が低下する遺伝子が多数認められた。この中で、血管炎の病態に直接関与する可能性がある遺伝子について mRNA および蛋白レベルでの発現変動を確認した。将来的には、これらの蛋白を治療効果の判定に用いたり、新しい治療標的として治療法を開発したりする可能性が考えられる。また急性期の川崎病患者血清によって、培養 HUVEC の管腔形成能と透過性機能が強く障害されることを見出した。IVIG 療法への反応性と、治療後血清における機能障害作用の減弱とはよく一致しており、IVIG 療法の作用機序を考える上で有用な所見と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Abe J, Jibiki T, Noma S, Nakajima T, Saito H, Terai M. Gene-expression profiling of the effect of high-dose intravenous immunoglobulin in patients of Kawasaki Disease. *J Immunol*, 2005 (in press)
2. Nomura I, Abe J, Noma S, Saito H, Gao B, Wheeler G, Leung D. Adrenomedullin is highly expressed in blood monocytes associated with acute Kawasaki disease: a microarray gene expression study. *Pediatr Res*. 2005, 57: 49-55.
3. Kano H, Ito Y, Matsuoka K, Nakajima T, Iwata T, Kohsaka T, Saito H, Abe J. Critical role of T cell-migration in bacterial superantigen-mediated shock in mice. *Clin Immunol*, 2004, 110: 159-171.

2. 学会発表

1. Abe J, Terai M, Jibiki T, Noma S, Nakajima T, Saito H. DNA Microarray Analysis of Kawasaki Disease Patients Treated with High-dose Intravenous Immunoglobulin Infusion. 12th Int Congr Immunol, Montreal, Canada. Jul 4-8, 2004.
2. 東 浩二、江畑亮太、遠山貴子、本田隆文、安川久美、寺井 勝. 急性期川崎病冠動脈瘤患者にみられるインビトロ血管内皮細胞管腔形成不全のメカニズム 第 52 回日本心臓病学会、京都、日本、Sep.13-15, 2004
3. Higashi K, Ebata R, Honda T, Yasukawa K, Toyama T, Jibiki T, Hamada H, Kanazawa M, Terai M. Impairment of serum angiogenic activity in acute Kawasaki Disease: 8th International Kawasaki Disease Symposium, San Diego, CA, USA, Feb.17-20, 2005

G. 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