

10. Shan ZZ, Masuko-Hongo K, Dai SM, Nakamura H, Kato T, Nishioka K. A role of 15d-PGJ2 in chondrocyte apoptosis. *JBC* 2004; 279:37939-37950.
  11. Fukuda Y, Yotsuyanagi H, Ooka S, Sekine T, Koike J, Takano T, Suzuki M, Itoh F, Nishioka K, Kato T. Identification of a New Autoantibody in Patients With Chronic Hepatitis. *Hum Immunol*. 2004 Dec; 65(12): 1530-8.
  12. Karasawa R, Ozaki S, Nishioka K, Kato T. Autoantibodies to Peroxiredoxin I and IV in patients with systemic autoimmune diseases. *Microbiol. Immunol*. 2005; 49(1): 57-65.
  13. Yudoh K, Trieu NV, Nakamura H, Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K. Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function. *Arthritis Res Ther*. 2005; 7: R380-R391.
  14. 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. *Anal Biochem*. 2005; 340: 184-186.
  15. Yudoh K, Nakamura H, Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K. Catabolic stress induces expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  in articular chondrocytes: involvement of HIF-1 $\alpha$  in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2005; 7: R904-R914.
  16. Shibakawa A, Yudoh K, Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K, Nakamura H. The role of subchondral bone resorption pits in osteoarthritis: MMP production by cells derived from bone marrow. *Osteoarthritis Cartilage*. 2005 Aug;13(8):679-87.
  17. Du H, Masuko-Hongo K, Nakamura H, Xiang Y, Bao CD, Wang XD, Chen SL, Nishioka K, Kato T. The prevalence of autoantibodies against cartilage intermediate layer protein, YKL-39, osteopontin, and cyclic citrullinated peptide in patients with early-stage knee osteoarthritis: evidence of a variety of autoimmune processes. *Rheumatol Int*. 2004 Sep 18; [Epub ahead of print]
  18. 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*. 2005 Apr; 38(1):17-24. Epub 2005 Jan 12.
  19. Masuko-Hongo K, Kato T. Recent developments in treatment of osteoarthritis. *Current Drug Inflammation and Allergy* (in press).
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
 名称：強皮症の診断方法、強皮症の診断薬及び強皮症診断マーカー  
 出願番号：特願 2006-3783  
 出願日：平成 18 年 1 月 11 日  
 1. 実用新案登録なし。

「機能的」血管新生誘導過程における血管成熟性誘導機構に関する研究

分担研究者 居石 克夫 九州大学大学院医学研究院・教授

研究要旨

本研究では、塩基性線維芽細胞増殖因子（FGF-2）依存性機能的血管新生誘導過程における血管新生関連因子の時間的・空間的相互反応機序の検討を行った。FGF-2 遺伝子導入後期に発現亢進を認める内因性血管内皮細胞増殖因子（VEGF）-C および血小板由来増殖因子（PDGF）-BB は、血管内皮細胞の VEGF-C/FLT-4 連関による PDGF-BB 発現亢進機構と間葉系細胞の PDGF-BB/PDGF-βR 連関による VEGF-C 発現亢進機構の両方向性パラクラインループを介してそれぞれ発現が促進され、一方、このループの破綻は毛細血管の構造異常を示すことから FGF-2 が誘導する血管成熟性促進効果に重要な役割を担うシステムであることが明らかとなった。

A. 研究目的

これまで我々は、重症虚血下肢への FGF-2 遺伝子治療の有効性における内因性血管新生因子群の階層的制御機構の重要性を明らかにしてきた。本研究は階層的制御機構における VEGF-C, PDGF-BB の機能について、血管の成熟性誘導機構に焦点を当て、昨年の研究を発展させた。

B. 研究方法

in vivo では、C57BL/6 マウス重症下肢虚血モデルに対し、SeV-FGF-2 あるいは SeV-luciferase を筋注し各種血管新生因子遺伝子発現の経時的变化ならびにその変化に対する各種活性中和抗体全身投与の影響を real-time PCR 法で定量化し大腿筋肉組織を電顕的に観察した。in vitro では、ウシ血管内皮細胞（BCE）、ヒト血管平滑筋内皮細胞（HSMC）を各種リコンビナント蛋白で刺激し、VEGF-C, PDGF-B 発現を real-time PCR 法、ELISA 法で定量化した。

（倫理面への配慮）

本研究は九州大学組み換え DNA 実験委員会の承認のもと、P2 動物実験室で施行した。動物実験は、九州大学動物実験委員会の審査、許可を得た。

C. 研究結果

HSMCにおいて、FGF-2はVEGF-A、VEGF-Cの発現を亢進し、BCEにおいてPDGF-B発現に影響を与えないが、in vivo SeV-FGF-2導入により内因性 VEGF-A mRNA は導入一日目に、内因性 VEGF-C mRNA, PDGF-B mRNA

は導入七日目に発現亢進ピークを示した。この後期 VEGF-C 発現亢進は内因性 PDGF-BB の活性中和で、後期 PDGF-B の発現亢進は内因性 FLT-4 活性中和で抑制された。この時、電顕的に大腿筋肉組織には著明に拡張しペリサイトの脱落した毛細血管の出現を見た。in vitro では BCE での PDGF-BB 発現は FLT-4 シグナルで、HSMC における VEGF-C の発現は PDGF-βR を介したシグナルで亢進した。

D. 考察 E. 結論

血管内皮細胞の VEGF-C/FLT-4 と間葉系細胞の PDGF-BB/PDGF-βR 間に成立するパラクラインループは、血管成熟性に必須の因子である PDGF-BB の発現を持続的かつ増幅的に亢進するシステムであり、FGF-2 はこのシステムを活性化することで、血管成熟性誘導促進効果を惹起すると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表（2005年度）

*Human Pathol* 36:330-40, 2005,

*Cancer Res* 15;65:7241-8,2005

*Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 1938-44. 2005

*Am J Physiol* 2006 (in press),

*Circ Res* 2006 (in press)

2. 学会発表

日本病理学会、日本動脈硬化学会など約 50 件

G. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

特になし

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

誘導型血管炎マウスにおける活性化好中球の関与

分担研究者 鈴木和男 国立感染症研究所・生物活性物質部 室長

研究協力者：高橋 啓（東邦大・大橋病院・病理）

協力者：大川原明子（国立感染症研究所・生物活性物質部）

大野尚仁（東京薬科大学・薬学部）

**研究要旨：** MPO-ANCA 関連血管炎においては、MPO-ANCA および CRP、白血球の上昇に加え、活性化好中球が深くかかわっていることが明らかにされている。本年度は、血管炎誘導の初期応答について、CAWS 投与直後の炎症誘導の初期反応機構を解析した。末梢白血球数、特に、好中球数の増加、末梢好中球の MPO 放出能の亢進と、腹腔好中球からのサイトカイン IL-6 産生能が CAWS により亢進した。また、CAWS 投与直後の血漿中の炎症性サイトカイン濃度は、IL-1 $\beta$ 、IL-12、MIP-2、G-CSF の変動が認められ、血漿中の ICAM-1 レベルも上昇した。さらに、心大動脈での ICAM-1 の mRNA の発現も有意に増加した。これらの結果は、血管炎発症初期において、好中球の活性化と、炎症分子・サイトカインの産生・亢進が伴い、それに加え血管内皮細胞も応答して傷害がおこり血管炎誘導へと進展すると推定される。

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., et al. *Clinical Nephrology* 40, 256-264, 1993, A. I-Okawara, et al. *Nephrol., Dial. Transplant.* 9:1708-1715, 2004)。この活性化好中球には、好中球抗体 MPO-ANCA、その抗原である Myeloperoxidase (MPO)、補体やその他の活性化分子が深く関与している。関節リウマチ (RA)、全身性エリテマトーデス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 et al. *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 分子が細胞膜上に出していることが最近報告されている(Atzeni F et al. *Clin Exp Rheumatol.* 22:331-334, 2004)。また、タイプ II

コラーゲン抗体の投与により誘導される関節炎が、CD69 分子欠損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.* 15:987-92, 2003)。これらのことから、好中球の活性化に伴って好中球表面に出る MPO に加え CD69 のかわりも重要である。

しかし、血管炎の誘発初期には、これらの分子や炎症分子がどのように関与しているかについては解析が進んでいない。そこで、われわれがすでに報告した CAWS (*C. albicans* 培養外液より精製したマンノースを主要成分とする mannoprotein- $\beta$ -glucan 複合

体)をマウスに投与することによって動脈炎を発症するモデル系を用いて、その1回投与による誘導初期の分子動態、好中球の活性化状態を解析する。それに加え、CAWS 投与直後の、末梢好中球数およびサイトカインの血中の動態について検討し、併せて、誘導初期の血管内皮細胞傷害度合いを ICAM-1 の血中への遊離と心大動脈での ICAM-1 の mRNA の発現により検討することにした。これにより、血管炎の誘導初期から血管炎発症にいたるイベントにかかわる因子を明らかにする。

## B. 研究方法

**CAWS 投与初期応答:** PBS に懸濁した CAWS(カンジダ標準株 IF01385 由来、(大野尚仁[東京薬科大学・薬学部]により調製)を、C57BL/6N マウス(♂, 6w)腹腔内に投与後、10 分から 16 時間で経時的に屠殺して、各測定項目にて解析した。心採血(ヘパリン処理)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。

1. 末梢白血球数: CAWS 投与直後から経時的に採血した末梢血中の白血球数、好中球数、リンパ球、単球数をカウントした。
2. 末梢好中球の機能を解析—MPO 放出能: CAWS 投与直後から経時的に採血した末梢血中の単離した末梢好中球活性化状態を MPO 放出能により解析した。
3. 腹腔由来好中球を CAWS で刺激した時のサイトカイン産生の解析: 無処置マウスにカゼインを腹腔投与し腹腔から単離した好中球に、CAWS を作用させ、サイトカイン(IL-1 $\beta$ 、IL-6 および IL-10)産生能を ELISA 法により測定し、好中球活性化との関連について調べた。
4. 血漿中の炎症性サイトカイン濃度: CAWS 投与直後から経時的に採血した血漿中のサイトカイン

について、ELISA 法により測定した。

5. ICAM-1 の放出と mRNA の発現: CAWS 投与直後から経時的に採血した末梢血中の血液中の ICAM-1 の濃度を測定した。また、心大動脈局所における ICAM-1 の mRNA の発現について検討した。

(倫理面への配慮)

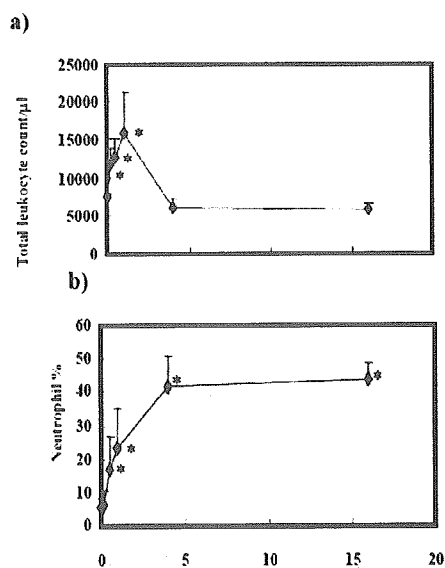
動物実験にあたっては、国立感染症実験動物計画委員会の承認を得て、動物愛護の指針にもとづいて行った。

## C. 研究結果

**血管炎の評価:** CAWS の 1 回投与によっても、5 日間連続投与で観察された冠状動脈炎が誘導されていることが認められた (data not shown)。

**血管炎誘導の初期応答:** CAWS 投与直後の炎症誘導の初期反応機構を、血中細胞数、血漿中のサイトカイン、好中球機能の経時的変動について解析した。

1. 末梢白血球数: CAWS 投与直後 10 分から、末梢白血球が増加し、特に、好中球数の増加が著しかった (図 1)。



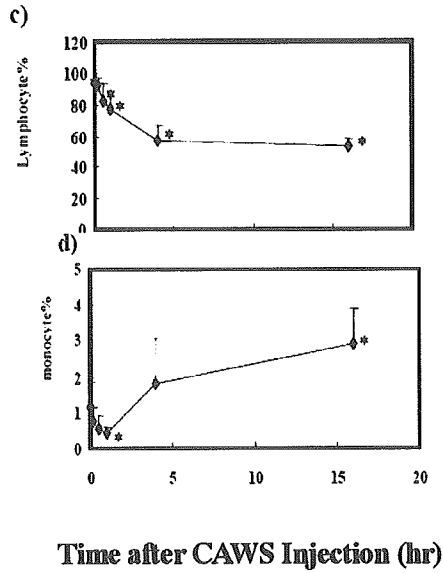


図1. CAWS 投与初期の末梢白血球数の変動  
\*p<0.05

## 2. 末梢好中球の機能を解析—MPO 放出能:

CAWS 刺激後の末梢好中球の活性化状態を、まず、MPO 放出能について調べた。その結果、末梢血から単離した好中球からの *in vitro* での MPO 放出能が亢進していた(図2)。

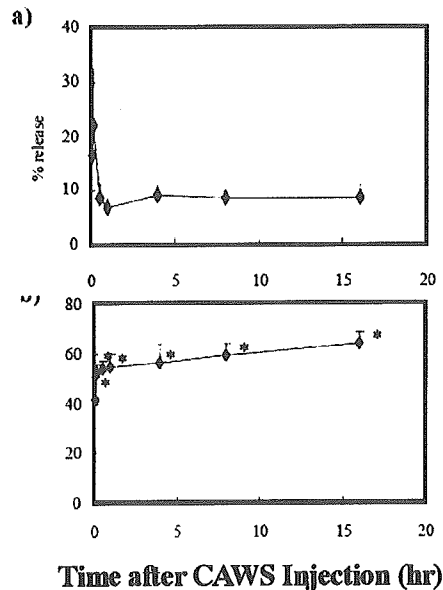


図2. 好中球機能: 末梢好中球の *in vitro* での MPO 放出能の亢進

a.無刺激、b: fMetLeuPhe 刺激。\*p<0.05

## 3. 好中球のサイトカイン産生能:

同様に、無処置正常マウスの腹腔から単離した末梢好中球に、直接 CAWS を作用させ、*in vitro* において、CAWS で刺激した好中球からのサイトカイン産生を検討した。その結果、図3に見られるように、IL-6 が認められたが、IL-1 $\beta$  産生および IL-10 の産生増加はなかった。

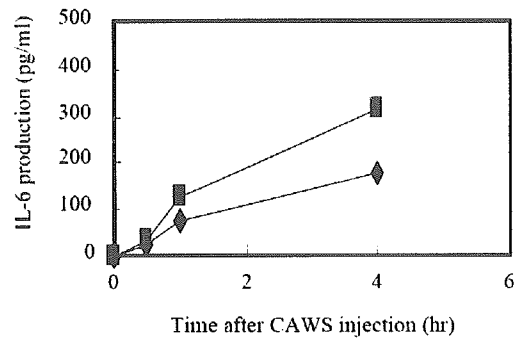


図3. *in vitro* で腹腔好中球を CAWS 刺激した時の IL-6 の産生増加

## 4. 血漿中の炎症性サイトカイン濃度:

次いで、CAWS 投与初期の血中サイトカインの変動をしらべ、IL-1 $\beta$ 、IL-12、MIP-2、G-CSF の変動を認めた。特に、IL-6 の変動は、かなり初期の段階で上下することがわかった(図4)。

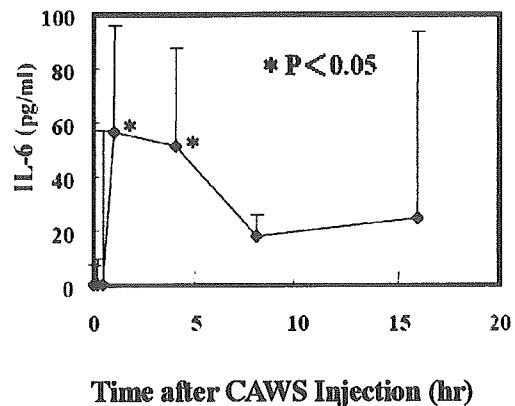


図4. CAWS 投与初期の血中 IL-6 レベルの変動

## 5. ICAM-1 の血漿への放出と mRNA の発現:

一方、CAWS 投与初期では、好中球の活性化により、MPO や IL-1 $\beta$ 、IL-6 の炎症性サイトカインが放出され、また、末梢血中には、サイトカインが産生されることから、血管内皮細胞の活性化が生じていると考えられた。そこで、血漿中の ICAM-1 の濃度測定、心大動脈局所における ICAM-1 の mRNA の発現について検討した。

内皮細胞の傷害度合いを ICAM-1 の血中濃度をしらべ、ICAM-1 濃度の有意な増加を認めた(図5a)。また、心大動脈での mRNA の発現も有意に上昇していた(図5b)。

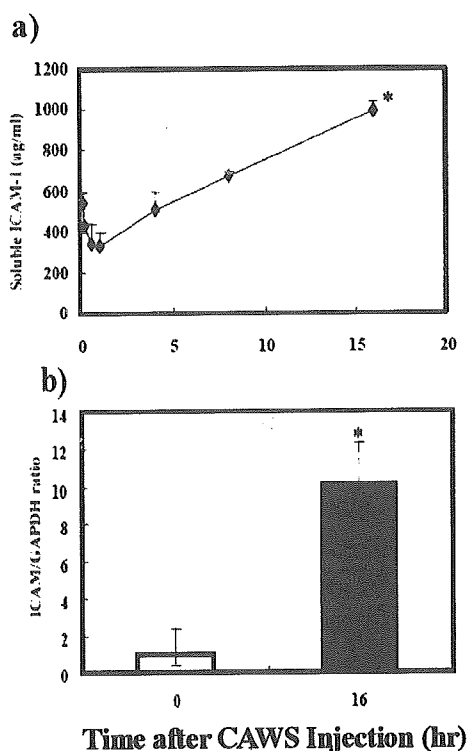


図5. 血中への ICAM-1 の放出と mRNA 発現上昇

a: ICAM-1 の血中への放出

b: 心大動脈での ICAM-1 の mRNA の発現。

\*P<0.05

## D. 考察

CAWS 投与初期応答を検討し、CAWS 投与初期

の血中細胞数、血漿中のサイトカイン、好中球機能の経時的変動について解析した。投与直後 10 分から、末梢好中球数が増加したことは、炎症が急速に拡大していることをしめしている。また、CAWS 投与直後から経時的に採血・単離した好中球を *in vitro* にて機能解析した結果、活性酸素産生および MPO 放出能が亢進した。この結果は、炎症誘導機構に初期好中球機能が関与していることを示しており、さらに好中球から IL-6 の産生が亢進しており、さらに炎症を惹起していると思われる。これを裏付けるように、CAWS 投与直後の血漿中の炎症性サイトカイン (IL-1 $\beta$ 、IL-12、MIP-2、G-CSF、ICAM-1) の有意な増加があり、これから引きがねになって好中球の活性化をさらに誘導していると推定される。

これらの現象に加え、血漿中の ICAM-1 が上昇したことは、血管内皮細胞の傷害が進んでいることを示しており、心大動脈での mRNA の発現が上昇することから、ICAM-1 の誘導が mRNA にも及んでおり、初期反応に血管内皮細胞も応答して傷害程度がさらに進んでいることを示唆している。

## E. 結論

血管炎誘導の初期応答について、CAWS 投与直後の炎症誘導の初期反応機構を、血中細胞数、血漿中のサイトカイン、好中球機能の経時的変動について解析した。その結果、

1. 末梢白血球数特に、好中球数が著しく増加した。
2. 腹腔好中球の機能を解析し、MPO 放出能が亢進していた。また、好中球のサイトカイン IL-6 産生能が CAWS により亢進した。
3. CAWS1 投与直後の末梢血中の炎症性サイトカイン濃度は、IL-1 $\beta$ 、IL-12、MIP-2、G-CSF に変動を認めた。
4. 血漿中の ICAM-1 が上昇し、心大動脈での mRNA の発現も有意に増加していた。

これらの結果から、血管炎発症初期においては、好中球の活性化がおこり、炎症分子・サイトカインの

産生・亢進があり、これらの初期反応に血管内皮細胞も応答して傷害が進み血管炎誘導へと進展すると推定される。

尚、本研究は、発表者のほか、大川原明子(国立感染研)、大野尚仁東京薬大教授、中山俊憲千葉大・院医教授の教室との共同研究によって行った。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Y. Hamano, K. Tsukamoto, M. Abe, G.D. Sun, D. Zhang, H. Fujii, S. Matsuoka, M. Tanaka, A. Ishida-Okawara, H. Tachikawa, H. Nishimura, K. Tokunaka, O. Hino, S. Hirose, and K. Suzuki. Genetic Dissection of Vasculitis, Myeloperoxidase-Specific Antineutrophil Cytoplasmic Antibody Production, and Related Traits in Spontaneous Crescentic Glomerulonephritis-Forming/Kinjoh Mice. *J. Immunol.*, in press, 2006.
2. W. Yumura, M. Itabashi, A. Ishida-Okawara, K. Tomizawa, J. Yamashita, Y. Kaneshiro, H. Nihei, and K. Suzuki. A Novel Mouse Model for MPO-ANCA-Associated Glomerulonephritis. *Microbiol.Immunol.* in press, 2006.
3. N. Nagai-Miura, T. Harada, H. Shinohara, K. Kurihara, Y. Adachi, A. Ishida-Okawara, T. Oharaseki, K. Takahashi, S., Naoe, K. Suzuki and N. Ohno. Lethal and severe coronary arteritis in DBA/2 mice induced by fungal pathogen, CAWS. *Atherosclerosis* in press, 2006.
4. A. S. Persad, Y. Kameoka, S. Kanda, Y. Niho, K. Suzuki. Arginine to Cysteine Mutation (R499C) Found in a Japanese Patient with Complete Myeloperoxidase Deficiency. *Gene Expression* in press, 2006.
5. H. Yasuda, N. Yoshizawa, K. Suzuki Modeling on social spread from immunity. *Jpn J Infect Dis*, 58, S14-S15, 2005
6. K. Suzuki, K. Yamamoto and H. Yoshikura. Focusing on Assessment of Risk to Communities in International Symposium on Infectious Agent Transmission Model Building. *Jpn J Infect Dis*, 58, S1-S2, 2005.
7. T. Matsuki, K. Isoda, R. Horai, A. Nakajima, Y. Aizawa, K. Suzuki, F. Ohsuzu, and Y. Iwakura. Involvement of TNF- $\alpha$  in the development of T cell-dependent aortitis in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *Circulation* 112: 1323-1331, 2005.
8. T. Ito-Ihara, T. Ono, F. Nogaki, K. Suyama, M. Tanaka, S. Yonemoto, A. Fukatsu, T. Kita, K. Suzuki, and E. Muso. Clinical Efficacy of Intravenous Immunoglobulin for Patients with MPO-ANCA-associated Rapidly Progressive Glomerulonephritis. *Nephron Clin Pract.* 102:c35-c42, 2005
9. R. Suzuki, K. Tomizawa, K. Suzuki, M. Tanokura. MPO-ANCA binding site on MPO molecule estimated from epitope mapping study and molecular modeling. *Bioimages* 12: 85-90, 2005.
10. M. Fujieda, K. Suzuki, H. Sato, M. Hattori, N. Wada, M. Tsuchiya, N. Okamoto, T. Murata, M. Matsudaira, M. Shimizu, K. Ohta, K. Naruse, S. Sugihara and H. Wakiguchi. Epitope analysis of myeloperoxidase-specific antineutrophil cytoplasmic autoantibodies (MPO-ANCA) in childhood onset Graves' disease treated with propylthiouracil. *Clinical Nephrology*, 63:437-445, 2005.
11. 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.* 49: 181-189, 2005.
12. 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.
2. 学会発表  
国際会議
1. Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., Maeda, N., and Koyama, H: Contribution of the myeloperoxidase-dependent oxidative system to the host defense against *Cryptococcus neoformans*. 13th Gordon Research Conference, Connecticut, USA.
  2. K. Suzuki, K. Murayama, T. Nagao, T. Oharaseki, A. Hasegawa, A. I. Okawara, N. N. Miura, N. Watanabe, M. Handa, K. Takahashi, N. Ohno, H. Minamitani, T. Nakayama, T. Arai. Contribution of CD69 to the development of coronary aeteritis induced with a vasculitis Inducer *Candida albicans* water soluble fraction. 13th Gordon Research Conference, Connecticut, USA.
  3. N. Ohno, N. N. Miura, H. Shinohara, H. Sankawa, Y. Adachi, A. I. Okawara, and K. Suzuki. Strain dependency of CAWS-induced coronary arteritis in mice. 12th International ANCA workshop, Heidelberg, Germany.
  4. Eri Muso, Toshiko Ito-Ihara, Takahiko Ono, Enyu Imai, Kunihiro Yamagata , Akira Akamatsu, Kazuo Suzuki. Establishment of the evidence of beneficial effect of Intravenous immunoglobulin (IVIg) therapy on MPO-ANCA related polyangiitis combining rapidly progressive glomerulonephritis (RPGN) in Japan. 12th International ANCA workshop, Heidelberg, Germany.
  5. Toshiko Ito-Ihara, Kazuko Uno, Akiyoshi Hoshino, Kenji Yamamoto, Toshiyuki Komiya, Akiko Ishida-Okawara, Atsushi Fukatsu, Toru Kita, Kazuo Suzuki, and Eri Muso. Sensitive detection of myeloperoxidase expression on neutrophil of patients with myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody-associated glomerulonephritis. 12th International ANCA workshop, Heidelberg, Germany.
  6. S. Fujimoto, S. Uezono, S. Hisanaga, K. Fukudome, S. Kobayashi, N. Tamura, K. Suzuki, H. Hashimoto, H. Nunoi. Incidence of primary renal vasculitis in Miyazaki, Japan. 12th International ANCA workshop, Heidelberg, Germany.
  7. S. Kobayashi, N. Tamura, T. Ihara, E. Muso, K. Suzuki, M. Yoshida, K. Nakabayashi, N. Tsuchiya, M. Kurosawa, Y. Inaba, S. Fujiimoto, H. Nunoi, H. Hashimoto. Prevalence of microscopic polyangiitis/Wegener's granulomatosis and the ratio of P-,MPO-/C-,PR-3- ANCA in ANCA-associated vasculitis in Japan. 12th International ANCA workshop, Heidelberg, Germany.
  8. A.Ishida-Okawara, N. Nagi-Miura, T. Oharaseki, N. Ohno, K. Takahashi, H. Okamura, P.A. Ward, K. Suzuki. Neutrophil activation as in initial step with CAWS in mouse. 12th International ANCA workshop, Heidelberg, Germany.
  9. K. Suzuki, K. Murayama, T. Nagao, T. Oharaseki, A. Hasegawa, A. Ishida-Okawara, N. N. Miura, N. Watanabe, M. Handa, K. Takahashi, N. Ohno, H. Minamitani, T. Nakayama, T. Arai. Contribution of CD69 to the development of coronary aeteritis induced with a vasculitis Inducer *Candida albicans* water soluble fraction. 12th International ANCA workshop, Heidelberg, Germany.
  10. Hoshino, T. Nagao, K. Murayama, A. Ishida-Okawara, T. Ito-Ihara, K. Uno, E. Muso, N. Nagi-Miura, N. Ohno, S. Naoe, K. Tokunaka, M. Yasuhara, K. Yamamoto and K. Suzuki. Trace of antibody to myeloperoxidase



- (MPO) with nanocrystal quantum dots-labeled antibody recognizing activating neutrophils in glomerulonephritis and a vasculitis inducer CAWS-injected mice. 12th International ANCA workshop, Heidelberg, Germany.
11. T. Ito-Ihara, K. Uno, T. Ono, A. Fukatsu, T. Kita, K. Suzuki, and E. Muso. Circulating myeloperoxidase and cytokine profiles in myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody-associated glomerulonephritis. 3rd World Congress of Nephrology. Singapore.
  12. Kura F, Kobayashi S, Amemura-Mackawa J, Aratani Y, Suzuki K, Watanabe H. Contribution of the myeloperoxidase-dependent oxidative system to the host defense against *Legionella pneumophila*. 6th International Conference on Legionella. October 16-20, 2005, Chicago, USA.
  13. Miura NN, Komai M, Shingo Y, Adachi Y, Okawara AI, Oharaseki T, Takahashi K, Naoe S, Suzuki K, Ohno N. Cytokine synthesis of splenic lymphocytes in murine coronary arteritis model induced by CAWS (*Candida albicans* water-soluble fraction) administration. International Cytokine Society Conference 2005, October 27-31, 2005, Seoul, Korea.
  14. Suzuki K. Estimation of the development of rapid progressive glomerulonephritis (RPGN) by the Quantum Dots. International Symposium on Colloidal Quantum Dots for Bio-Medical Applications and Their Safety, November 26, 2005, Kobe, Japan.
  15. A. Hoshino, T. Nagao, K. Fujioka, T. Ito-Ihara, K. Uno, E. Muso, K. Murayama, A. Ishida-Okawara, N. Nagi-Miura, N. Ohno, S. Naoe, K. Tokunaka, M. Yasuhara, K. Yamamoto, and K. Suzuki. Trace of Antibody to Myeloperoxidase with Nanocrystal Quantum Dot-Labeled Antibody Recognizing Activating Neutrophils in Glomerulonephritis and Vasculitis Inducer *Candida albicans* Water-Soluble Glycoprotein-Injected Mice. The International Society for Optical Engineering-BIOS 2006 - Symposia - Photonics West 2006 - Program - Conferences 21-26 January 2006, San Jose, California, USA
  16. K. Suzuki. Needs of Synthetic IVIg in the World. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. February 7, 2006, Tokyo, Japan.
  17. T. Nozu, M. Kondo, K. Suzuki, A. Nagai, Prevalence and clinical manifestation of pulmonary fibrosis in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. February 7, 2006, Tokyo, Japan.
  18. K. Takahashi, K. Suzuki, et al. The Effect of Synthetic Immunoglobulin (SyIG) in Mice Vasculitis Model caused by CAWS. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. February 7, 2006, Tokyo, Japan.
  19. N. Ohno, K. Suzuki, et al. Culture condition modulates active moiety of CAWS, vasculitis inducer from *C. albicans*. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. February 7, 2006, Tokyo, Japan.
  20. A.I. Okawara, K. Suzuki, et al. Activation of neutrophils in the initial step of arteritis induction by CAWS. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. February 7, 2006, Tokyo, Japan.
  21. T. Ito-Ihara, K. Suzuki, et al. Circulating Levels of IL-12, 23 and IL-18 in Patients with MPO-ANCA-associated Vasculitis. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. February 7, 2006, Tokyo, Japan.
  22. T. Ono, K. Suzuki, et al. The relationship between renal lesions and lung vascular lesions in SCG/Kj mice as a model of ANCA-associated crescentic glomerulonephritis. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of

- Collaboration between Basic Research and Clinical Research. February 7, 2006, Tokyo, Japan.
23. W. Yumura, K. Suzuki, et al. A Novel Mouse Model for MPO-ANCA-Associated Glomerulonephritis - Analysis of Pathogenesis. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. February 7, 2006, Tokyo, Japan.
  24. Y. Yamanishi, K. Suzuki, et al. Usefulness of nMPO-ANCA in diagnosing and treating vasculitis - discrepancy between MPO-ANCA and nMPO-ANCA-. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. February 7, 2006, Tokyo, Japan.
  25. M. Furutani, K. Suzuki, et al. Synthetic polyclonal immunoglobulin. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. February 7, 2006, Tokyo, Japan.
5. 鈴木和男、村山研、長尾朋和、大川原明子、大原関利章、高橋啓、長谷川明洋、三浦典子、大野尚仁、渡邊直英、半田誠、南谷晴之、野津朋子、永井厚志、新井孝夫、中山俊憲 *Candida albicans* water soluble fraction(CAWS)によって誘導される冠狀動脈炎の発症への CD69 の関与 生体防御機能ワークショップ 2005 -第2回香川ガレクチンカンファレンス共催 6月9日-10日(高松)
  6. 猪原登志子、古宮俊幸、宇野賀津子、田原佐知子、辻井知美、塚本達雄、小野孝彦、岸田綱太郎、鈴木和男、深津敦司、北徹、武曾恵理 MPO-ANCA 関連急速糸球体腎炎の血中サイトカインの動態 第48回日本腎臓学会学術総会 6月24日(横浜)
  7. 星野昭芳、長尾朋和、村山研、大川原明子、猪原登志子、武曾恵理、宇野賀津子、三浦典子、大野尚仁、直江史郎、徳中一寛、安原真人、山本健二、鈴木和男 血管炎発症初期の好中球活性化に関与する血中サイトカインの変動と QD 標識 MPO 抗体の *in vivo* トレース 第70回 日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 7月20-21日(京都)
  8. 長尾朋和、村山研、大川原明子、大原関利章、高橋啓、長谷川明洋、三浦典子、大野尚仁、渡邊直英、半田誠、南谷晴之、野津朋子、永井厚志、新井孝夫、中山俊憲、鈴木和男 CD69 関与の血管炎発症に連動する8種サイトカインの挙動第70回 日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会7月20-21日(京都)
  9. 猪原登志子、宇野賀津子、古宮俊幸、辻井知美、塚本達雄、岸田綱太郎、小野孝彦、鈴木和男、深津敦司、北徹、武曾恵理 ANCA 関連血管炎症候群における IL-12 と IL-18 の動態 第70回 日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 7月20-21日(京都)
  10. 武曾恵理、猪原登志子、古宮俊幸、宇野賀津子、岸田綱太郎、鈴木和男 シンポジウム1『生体防御異常が誘発する難治性疾患』難治性血管炎の発症機序と治療戦略第16回日本生体防御学会学術総会8月4日~8月6日(東京)

## 国内会議

1. 荒谷康昭、倉 文明、渡辺治雄、高野幸枝、鈴木和男、小山秀機 真菌感染と好中球機能第78回 日本細菌学会総会シンポジウム 4月4日-5日(東京)
2. 多田 壘、三浦典子、安達禎之、鈴木和男、大野尚仁 *Candida albicans* 菌体由来多糖画分と LPS (*E. coli* O9)の免疫化学・生物活性の交差反応性の解析 第78回日本細菌学会総会 4月4日-6日(東京)
3. 鈴木和男 安全なガンマグロブリン製剤-血管炎治療をめざして- 第12回代替血液学会 6月6-7日(東京)
4. 原田 敏江、川南 裕美、三浦 典子、安達 禎之、鈴木 和男、大野 尚仁 真菌多糖による GM-CSF を介したサイトカイン産生誘導機構 生体防御機能ワークショップ 2005 -第2回香川ガレクチンカンファレンス共催 6月9日-10日(高松)

11. 荒谷康昭、倉文明、渡辺治雄、高野幸枝、赤川久義、鈴木和男、小山秀機好中球の機能異常が誘発する真菌感染 第16回日本生体防御学会学術総会 8月4日～8月6日(東京)
12. 亀岡洋祐、伊東玲子、笠間毅、鈴木哲朗、猪原登志子、武曾恵理、鈴木和男 ミエロペルオキシダーゼ遺伝子コード領域の多型(SNP)と炎症性疾患の重篤度との関係 第16回日本生体防御学会学術総会 8月4日～8月6日(東京)
13. 倉文明、小林静史、前川純子、常彬、荒谷康昭、鈴木和男、渡辺治雄 シンポジウム3『生体防御の役割をになう新ファミリー-NOX: 植物-動物』*Legionella pneumophila* に対する感染防御機構、NOX2 など 第16回日本生体防御学会学術総会 8月4日～8月6日(東京)
14. 鈴木和男 パネルディスカッション『感染症防御-歴史と新しい研究アプローチに向けて』 第16回日本生体防御学会学術総会 8月4日～8月6日(東京)
15. 大川原明子、三浦典子、大原関利章、高橋啓、柏村信一郎、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16回日本生体防御学会学術総会 8月4日～8月6日(東京)
16. 長尾朋和、村山研、野津朋子、大川原明子、大原関利章、高橋啓、長谷川明洋、三浦典子、大野尚仁、渡邊直英、半田誠、南谷晴之、永井厚志、新井孝夫、中山俊憲、鈴木和男 CD69 分子と活性化好中球による血管炎発症 第16回日本生体防御学会学術総会 8月4日～8月6日(東京)
17. 星野昭芳、長尾朋和、村山研、大川原明子、猪原登志子、武曾恵理、宇野加津子、三浦典子、大野尚仁、直江史郎、徳中一寛、安原真人、山本健二、鈴木和男量子ドット(QD)標識抗マウス MPO 抗体を用いた血管炎発症に関わる活性化好中球 MPO 分子の蛍光による検出 第16回日本生体防御学会学術総会 8月4日～8月6日(東京)
18. 荒谷康昭、倉 文明、渡辺治雄、赤川久義、高野幸枝、鈴木和男、Nobuyo Macda、小山秀機 ミエロペルオキシダーゼ欠損マウスのクリプトコッカス感染防御能の低下 第11回MPO研究会 10月15～16日(福岡)
19. 大野 尚仁、篠原 弘靖、三浦 典子、石橋健一、安達 禎之、大川原明子、鈴木 和男、大原関利章、高橋 啓、直江史郎 真菌由来のPAMPs, *Candida albicans* Water-soluble fraction (CAWS) の血管炎惹起能における $\beta$ マンノース残基の影響」第11回MPO研究会 10月15～16日(福岡)
20. 亀岡洋祐、Persad A、鈴木和男 「ミエロペルオキシダーゼのリーダーペプチドに対する抗体の性状 第11回MPO研究会 10月15～16日(福岡)
21. 富澤一夫、鈴木倫太郎、田之倉優、鈴木和男 ヒトMPO分子におけるMPO-ANCAエピトープ解析 第11回MPO研究会 10月15～16日(福岡)
22. 武曾恵理、鈴木進子、岩崎由加子、辻井知美、古宮俊幸、米本智美、塚本達雄、猪原登志子、宇野賀津子、鈴木和男 MPO-ANCA 関連腎炎血管炎に合併する悪性疾患症例の解析と考察 第11回MPO研究会 10月15～16日(福岡)
23. 猪原登志子、宇野賀津子、古宮俊幸、辻井知美、塚本達雄、岸田綱太郎、小野孝彦、鈴木和男、深津敦司、北徹、武曾恵理 ANCA 関連血管炎症候群におけるIL-12、IL-23とIL-18の動態 ANCA 関第11回MPO研究会 10月15～16日(福岡)
24. 大川原 明子、三浦 典子、大原関 利章、高橋 啓、柏村 信一郎、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11回MPO研究会 10月15～16日(福岡)
25. 鈴木和男、長尾朋和、村山研、大川原明子、大原関利章、高橋啓、長谷川明洋、三浦典子、大野尚仁、渡邊直英、半田誠、南谷晴之、野津朋子、永井厚志、新井孝夫、中山俊憲 好中球血管炎発症にかかわるCD69分子と活性化好中球 第11回MPO研究会 10月15～16日(福岡)
26. 松村実美子、長尾朋和、三川浩輝、村山 研、大川原明子、南谷晴之、鈴木和男血管炎発症機構の解

- 析：MPO-ANCA と好中球の糸球体内皮細胞への作用 第11回MPO研究会 10月15～16日(福岡)
27. 猪原登志子、宇野賀津子、古宮俊幸、辻井知美、塚本達雄、岸田綱太郎、小野孝彦、鈴木和男、深津敦司、北徹、武曾恵理 ANCA 関連血管炎症候群におけるIL-12, IL-23 とIL-18の動態 第11回MPO研究会 10月15～16日(福岡)
  28. 鈴木和男、星野昭芳、長尾朋和、猪原登志子、宇野賀津子、徳中一寛、大川原明子、三浦典子、大野尚仁 Qドットによる進行性糸球体腎炎の評価 第11回MPO研究会 10月15～16日(福岡)
  29. 松村実美子、長尾朋和、三川浩輝、村山 研、大川原明子、南谷晴之、鈴木和男血管炎発症機構の解析：MPO-ANCA と好中球の糸球体内皮細胞への作用 第14回日本バイオイメーキング学会 10月26～28日(東京)
  30. 富澤一夫、鈴木倫太郎、田之倉優、鈴木和男 ヒトMPO分子におけるMPO-ANCA エピトープ解析 第14回日本バイオイメーキング学会 10月26～28日(東京)
  31. 鈴木和男 好中球自己抗体MPO-ANCAの抗原性と病態 第33回臨床免疫学会 10月28～30日(京都)
  32. 鈴木和男 血管炎発症機構におけるCD69分子を介する好中球・血小板相互反応第28回日本血栓止血学会 11月23～25日(福岡)
  33. 飛田俊介、三浦典子、安達禎之、鈴木和男、中山俊憲、大野 尚仁  $\beta$ グルカンをを用いたコラーゲン誘発関節炎モデルにおけるCD69の発現解析第28回分子生物学会12月8～10日(福岡)
  34. 亀岡洋祐、笠間 毅、鈴木哲朗、猪原登志子、武曾恵理、橋本雄之、鈴木和男 ミエロペルオキシダーゼのリーダーペプチドの細胞内局在第28回分子生物学会 12月8～10日(福岡)
  35. 松村 実美子、長尾 朋和、三川 浩輝、村山 研、大川原 明子、南谷 晴之、鈴木 和男血管炎発症機構の解析：MPO-ANCA と好中球の糸球体内皮細胞への作用 第28回分子生物学会 12月8～10日(福岡)
  36. 野津朋子、松村実美子、大川原明子、長谷川明洋、中山俊憲、永井厚志、鈴木和男 活性化好中球関与の肺血管内皮細胞の機能解析第28回分子生物学会 12月8～10日(福岡)
  37. 富澤一夫、鈴木倫太郎、田之倉優、鈴木和男 ヒトMPO分子上のMPO-ANCA結合部位エピトープ解析 第28回分子生物学会 12月8～10日(福岡)
  38. 長尾朋和、大原関利章、長谷川明洋、大川原明子、三浦典子、野津朋子、高橋啓、大野尚仁、南谷晴之、新井孝夫、中山俊憲、鈴木和男 CD69 contributes to the development of vasculitis 第35回免疫学会 12月13～15日(横浜)
  39. 大川原明子、三浦典子、大原関利章、高橋啓、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 第35回免疫学会 12月13～15日(横浜)
  40. 鈴木和男、星野昭芳、長尾朋和、猪原登志子、宇野賀津子、徳中一寛、大川原明子、三浦典子、大野尚仁 血管炎発症初期の好中球活性化に関与する血中サイトカインの変動とQD標識MPO抗体のin vivo トレース 第35回免疫学会 12月13～15日(横浜)
  41. 大野尚仁、三浦典子、石橋健一、安達禎之、高橋啓、大原関利章、直江史郎、大川原明子、鈴木和男 *Candida albicans* 由来の血管炎惹起物質CAWSの活性部位の解析 第35回免疫学会 12月13～15日(横浜)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- 特になし

顕微鏡的多発血管炎における *KIR*, *LILR* 遺伝子多型に関する研究

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

研究協力者 宮下りサ、豆ヶ野剛一、徳永勝士

東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学分野

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 順天堂大学附属順天堂越谷病院

尾崎承一 聖マリアンナ医科大学リウマチ・膠原病・アレルギー内科

研究要旨

*KIR* はNK細胞やT細胞、*LILR* は単球・マクロファージ、顆粒球を主体に発現する活性化型、抑制型および可溶性受容体群であり、顕著な多型性が存在する。本年度は、*KIR* 遺伝子座の有無、およびリガンドである *HLA-class I* の遺伝子型との組み合わせ、さらに活性化型 *LILR* の一つである *LILRA2* 多型と顕微鏡的多発血管炎(MPA)との関連を解析した。

MPA 群では、活性化型受容体である *KIR2SD3* の陽性率が有意に減少していた。また、リガンドである *HLA-class I* と抑制型・活性化型受容体の組み合わせの検討では、*HLA-B Bw4* 陽性、*KIR3DL1* (抑制型) 陽性、*KIR3DS1* (活性化型) 陰性群がMPAに有意に増加していた。さらに、これに *HLA-C* と *KIR2DL1* の組み合わせを考慮した場合も、抑制シグナルが優位になるに従ってMPAの疾患感受性が上昇する傾向が認められた。

一方、*LILRA2* の解析では、スプライス受容部位に位置する多型とMPAとの関連が検出された。MPA 関連アレルでは、3アミノ酸の欠失を伴う新規アイソフォームが細胞表面に発現することが示唆された。

A. 研究目的

*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多重遺伝子ファミリーであり、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。昨年度、予備的な成果を報告したが、本年度は、さらに解析検体数を増やして解析した。

一方、*LILR* (leukocyte immunoglobulin-like receptor, *ILT*, *LIR* と呼ばれる)遺伝子群は、やはり19q13.4に *KIR* ファミリーに隣接して位置する多重遺伝子ファミリーで、活性化型、抑制型、可溶性受容体および偽遺伝子を合わせて13の遺伝子座から構成される。単球・マクロファージ、樹状細胞、顆粒球を中心に、血球系に広範に発現し、免疫寛容やサイトカイン産生制御などにおける役割が示されている。われわれは、*LILR* ファミリーの多型解析と関連研究を系統的に進めており、これらの遺伝子群が多型に富み、免疫疾

患感受性との関連も見られることを見出している。

本研究では、活性化型 LILRA2 のスプライシング受容部位に位置する SNP と MPA との関連を検討した。

## 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 ANCA 関連血管炎患者につき、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、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。

LILRA2 多型は、直接塩基配列決定法を用いて遺伝子型を決定した。アリル特異的な転写産物の塩基配列は、健常者の末梢血から調整した RNA をテンプレートとした RT-PCR 産物の解析により決定した。新規アイソフォームの細胞表面発現は、フロー・サイトメトリーにて検討した。

遺伝子型と疾患との関連は、 $\chi^2$  検定、および必要なときには Fisher の正確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 文部科学省・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

各 KIR 遺伝子座の有無による多型の検討では、活性化受容体である KIR2DS3 の陽性率が、健常対照群の 16.7% と比較して、MPA 群では 4.7% と、有意に減少していた（オッズ比 [OR] 0.24, 95% 信頼区間 [CI] 0.06-0.94,  $P=0.038$ ）（表 1）。この関連は、MPA 以外の MPO-ANCA 陽性例（Churg-Strauss 症候群 8 例、Wegener 肉芽

腫症 3 例、古典的結節性多発動脈炎 3 例）を加えた場合は有意差に到達しなかった。

次に、リガンドである HLA-class I と活性化型 KIR, 抑制型 KIR 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-B Bw4 陽性かつ抑制型の KIR3DL1 陽性、活性化型の KIR3DS1 陰性群が、MPA に有意に増加していた（46.5% vs 27.0%, OR 2.35, 95%CI 1.18-4.79,  $P=0.014$ ）（表 2）。さらに、これに HLA-C group 2 と抑制型の KIR2DL1 の組み合わせをも追加して、活性化型シグナル優位、中立、抑制型シグナル優位の 3 群に分けて解析したところ、抑制型シグナルが優位になるにつれて、MPA のリスクが高くなる傾向が認められた（図 1）。

LILRA2 の多型解析では、イントロン 6 のスプライス受容部位に多型 (G>A) が存在し、スプライス受容モチーフが失われる A/A 遺伝子型が MPA に有意に増加していた（16.0% vs 8.8%, OR 2.52, 95%CI 1.07-5.95,  $P=0.049$ ）（表 3）。

A/A 遺伝子型の末梢血単核球 mRNA の解析により、A アリルでは、通常型の exon 7 のスプライス受容部位より 9 塩基下流の部位が 100% 使用されることが見出され、このために、免疫グロブリンドメインと膜貫通領域の間のリンカー部分に 3 アミノ酸の欠失を伴うアイソフォーム ( $\Delta 419-421$ ) のみが産生されると推測された。A/A 型の健常者のフロー・サイトメトリーにより、実際にこのアイソフォーム産物が細胞表面に発現することが確認された。

## D. 考察

MPA と KIR の関連解析では、いずれの解析においても、抑制型シグナルが優位となる遺伝子型が MPA 発症リスクと関連する傾向が観察された。このことは、ウイルスなどの感染症に対する抵抗性の減弱が MPA 発症の遺伝素因の一つとなる可能性を示唆すると思われる。ANCA 関連血管炎におけるウイルス感染の関与を示唆する報告は散見され、また、ANCA 関連血管炎の治療中にサイトメガロウイルス

ス感染症が重篤な合併症となることはしばしば経験される。本研究の結果は、ウイルスなどの感染症に対する抵抗性の減弱が、発症の一つの誘因となる可能性を示唆すると考えられる。

LILRA2は、単球・マクロファージ、樹状細胞、好中球などに発現する、リガンド未知の活性化型受容体であり、機能的には、TLRシグナルの調節やTh1サイトカインの抑制、Th2サイトカインの誘導が報告されている。今回関連が検出されたアリルは、スプライシングに影響し、リンカー部分の3アミノ酸が欠失したアイソフォームを細胞表面に発現することが示された。ANCA関連血管炎との関連の機序としては、好中球の過剰な活性化やTh1サイトカインの誘導が考えやすいが、今後の機能解析が必要である。

#### E. 結論

抑制シグナル優位の KIR/HLA-class I 遺伝子型の組み合わせとMPAの関連が見出された。また、スプライシングに影響を与える LILRA2 多型とMPAとの関連が見出された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kuroki K, Tsuchiya N, Shiroishi M, Rasubala L, Yamashita Y, Matsuta K, Fukazawa T, Kusaoi M, Murakami Y, Takiguchi M, Juji T, Hashimoto H, Kohda D, Maenaka K, Tokunaga K: Extensive polymorphisms of *LILRB1* (*ILT2*, *LIR1*) and their association with *HLA-DRB1* shared epitope negative rheumatoid arthritis. *Hum Mol Genet* 14: 2469-2480, 2005.
- 2) Kono H, Kyogoku C, Suzuki T, Tsuchiya N, Honda H, Yamamoto K, Tokunaga K, Honda Z: FcγRIIB Ile232Thr transmembrane polymorphism associated with human systemic lupus erythematosus decreases affinity to lipid rafts and attenuates inhibitory effects on B cell receptor signaling. *Hum Mol Genet* 14: 2881-2892, 2005.
- 3) Tsuchiya N, Kyogoku C: Role of Fcγ

receptor IIb polymorphism in the genetic background of systemic lupus erythematosus: Insights from Asia. *Autoimmunity* 38:347-352, 2005.

4) Tsuchiya N, Kobayashi S, Hashimoto H, Ozaki S, Tokunaga K: Association of *HLA-DRB1\*0901-DQB1\*0303* haplotype with microscopic polyangiitis in Japanese. *Genes Immun* (in press)

5) Miyashita R, Tsuchiya N, Yabe T, Kobayashi S, Hashimoto H, Ozaki S, Tokunaga K: Association of killer cell immunoglobulin-like receptor (*KIR*) genotypes with microscopic polyangiitis. *Arthritis Rheum* (in press).

6) 土屋尚之: ANCA関連血管炎疾患感受性遺伝子解析の現状。医学のあゆみ 214:63-66, 2005.

7) 土屋尚之: 病因:(1)遺伝。(長澤俊彦編「新しい診断と治療のABC 31 ANCA関連腎炎」)最新医学 別冊, pp.46-54, 2005.

##### 2. 学会発表

- 1) Mamegano K, Tsuchiya N, Kusaoi M, Fukazawa T, Hashimoto H, Matsuta K, Tokunaga K: Association of *LILRA2* (*ILT1*, *LIR7*) polymorphism with systemic lupus erythematosus. *Modern Rheumatol* 15(Suppl): S217, 2005.
- 2) Kuroki K, Shiroishi M, Rasubala L, Tsuchiya N, Kohda D, Tokunaga K, Maenaka K: Structural and expression analyses on *LILRB1* haplotypes associated with rheumatoid arthritis. *Modern Rheumatol* 15(Suppl): S246, 2005.
- 3) Kobayashi S, Tamura N, Ihara T, Muso E, Suzuki K, Yoshida M, Nakabayashi N, Tsuchiya N, Korosawa M, Inaba Y, Fujimoto S, Nuno H, Hashimoto H. Prevalence of microscopic polyangiitis/Wegener's granulomatosis and the ratio of MPO, PR-3-ANCA in patients with ANCA-associated vasculitis in Japan. The 12th International Vasculitis and ANCA Workshop June 15-18, 2005, Heidedlberg, Germany. (Abstract published in *Kidney &*

Blood Pressure Research, 2005: 28, 190-191)

4) 豆ヶ野剛一、土屋尚之、草生真規雄、深沢徹、松多邦雄、橋本博史、徳永勝士：LILRA2 (ILT1, LIR7)遺伝子多型と全身性エリテマトーデスとの関連。日本人類遺伝学会第50回大会抄録集 p149. 2005年9月19日～22日、倉敷。

5) 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：顕微鏡的多発血管炎の疾患感受性におけるKIR-HLA 遺伝子間相互作用の検討。日本人類遺伝学会第50回大会抄録集 p149. 2005年9月19日～22日、倉敷。

6) 土屋尚之：ヒトリウマチ性疾患の遺伝子解析による病態関連分子の検出（シンポジウム）。日本臨床免疫学会会誌 28:216, 2005. 第33回日本臨床免疫学会、2005年10月28日～29日、京都。

7) Kuroki K, Tsuchiya N, Shiroishi M, Rasubala L, Yamashita Y, Matsuta K, Fukazawa T, Kusaoi M, Murakami Y, Takiguchi M, Juji T, Hashimoto H, Kohda D, Maenaka K, Tokunaga K. Extensive polymorphisms of LILRB1 (ILT2, LIR1) and their association with HLA-DRB1 shared epitope negative rheumatoid arthritis. NK Hawaii. 9th Meeting of the Society for Natural Immunity, November 2005, Hawaii.

8) Miyashita R, Tsuchiya N, Yabe T, Kobayashi S, Hashimoto H, Ozaki S, Tokunaga K: Association of genetic interaction between killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) and HLA-B genes with microscopic polyangiitis. Arthritis Rheum 52(suppl):S649, 2005.

G. 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



表1 MPA、MPA を含む MPA-ANCA 陽性群および健常対照群における KIR 遺伝子陽性率

<i>KIR</i>	MPA (n=43)		MPO-ANCA+ (n=57)		健常対照群 (n=239)	
<i>2DL1</i>	41	(95.3%)	54	(94.7%)	238	(99.6%)
<i>2DL2</i>	8	(18.6%)	10	(17.5%)	33	(13.8%)
<i>2DL3</i>	42	(97.7%)	56	(98.2%)	239	(100.0%)
<i>2DL4</i>	43	(100.0%)	57	(100.0%)	239	(100.0%)
<i>2DL5</i>	16	(37.2%)	21	(36.8%)	116	(48.5%)
<i>2DS1</i>	15	(34.9%)	20	(35.1%)	109	(45.6%)
<i>2DS2</i>	8	(18.6%)	10	(17.5%)	35	(14.6%)
<i>2DS3<sup>a</sup></i>	2	(4.7%)	4	(7.0%)	40	(16.7%)
<i>2DS4</i>	36	(83.7%)	48	(84.2%)	208	(87.0%)
<i>2DS5</i>	14	(32.6%)	17	(29.8%)	77	(32.0%)
<i>3DL1</i>	43	(100.0%)	57	(100.0%)	227	(95.0%)
<i>3DL2</i>	42	(97.7%)	55	(96.5%)	237	(99.2%)
<i>3DL3</i>	43	(100.0%)	57	(100.0%)	239	(100.0%)
<i>3DS1</i>	15	(34.9%)	20	(35.1%)	110	(46.0%)

<sup>a</sup>MPA と健常対照群の比較:  $P=0.038$ ,  $OR=0.24$ ,  $95\%CI$  0.06–0.94.

表2 HLA-B Bw4, KIR3DL1, KIR3DS1 の組み合わせ

	<i>Bw4</i>	<i>KIR</i>	MPA (n=43)		MPO-ANCA+ (n=55)		健常対照群 (n= 163)	
(a)	+	<i>3DL1+/3DS1-</i>	20	(46.5%) <sup>a</sup>	21	(38.2%)	44	(27.0%)
(b)	-	<i>3DL1+/3DS1-</i>	8	(18.6%)	14	(25.5%)	39	(23.9%)
(c)	+	<i>3DL1+/3DS1+</i>	6	(14.0%)	8	(14.5%)	38	(23.3%)
(d)	-	<i>3DL1+/3DS1+</i>	9	(20.9%)	12	(21.8%)	33	(20.2%)
(e)	+	<i>3DL1-/3DS1+</i>	0	(0.0%)	0	(0.0%)	7	(4.3%)
(f)	-	<i>3DL1-/3DS1+</i>	0	(0.0%)	0	(0.0%)	2	(1.2%)

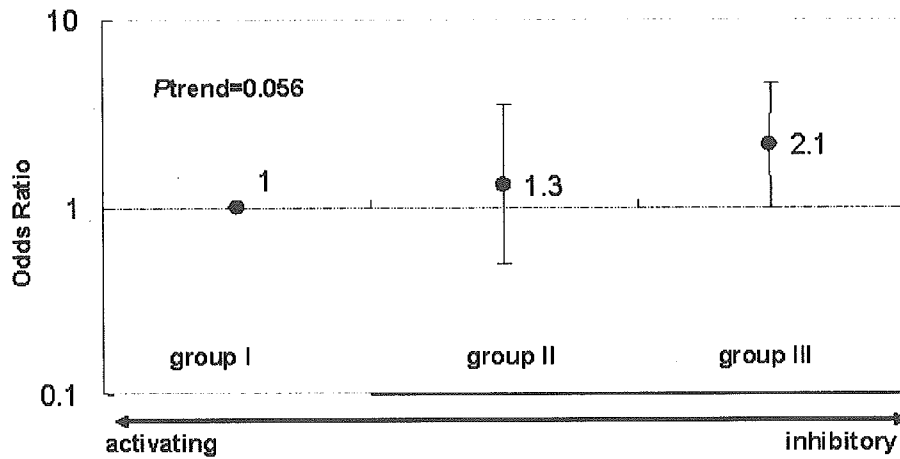
<sup>a</sup> *HLA-B Bw4+/KIR3DL1+/3DS1-* の組み合わせは、健常対照群と比較して、MPA 群に有意に増加していた( $OR= 2.35$  ,  $95\%CI$ : 1.18–4.70,  $P= 0.014$ )。

表3 LILRA2 (ILT1, LIR7) intron 6 スプライス受容部位多型と MPA の関連

	MPA (n=50)		健常対照群 (n=285)	
G/G	22	(44.0)	153	(53.7)
G/A	20	(40.0)	112	(39.3)
A/A	8	(16.0)	20	(7.0)

A/A vs (G/G + G/A) : OR 2.52, 95%CI 1.07-5.95,  $P = 0.049$

図1



group		KIR と HLA の組み合わせ		
		3DS1	3DL1/Bw4	2DL1/Cgrp2
I (activating)	a	+	-	-
	b	+	+	-
	c	+	-	+
II (neutral)	d	-	-	-
	e	+	+	+
III (inhibitory)	f	-	-	+
	g	-	+	-
	h	-	+	+

KIR と HLA-class I の組み合わせの有無により、患者群、対照群を a-h の 8 群に分類し、さらに、想定される活性化および抑制シグナルの強さにより、group I (activating), group II (neutral), group III (inhibitory) の 3 群に分類した。活性化シグナルを伝達する組み合わせを斜線、抑制シグナルを伝達する組み合わせを黒で示した。group I と比較した場合の group II, group III のオッズ比と 95%信頼区間を図に示した。抑制シグナルが優位になるに従って MPA のリスクが上昇する傾向が認められた (Miyashita et al., Arthritis Rheum in press)。

## 組換え近交系を用いた血管炎感受性遺伝子座の解析

分担研究者 能勢真人 愛媛大学医学部病因病態学講座ゲノム病理学分野教授

### 研究要旨

昨年に引き続き、組換え近交系 **MXH/lpr** を用いた血管炎病態、遺伝学的解析を行った。**MXH/lpr** は新たに 4 系統が作出され、計 15 系統を解析に用いることができるようになった。解析の結果、新たに作出された 4 系統の内 2 系統が血管炎好発系であり、**QTL**(quantitative trait loci)解析の結果、第 4 染色体に **significant level** の感受性遺伝子座をマップした。また、新たに **AlphaScreen** を用いたプロテオーム網羅的な新規自己抗体の検索を開始した。

### A. 研究目的

膠原病は複数の遺伝的要因と環境要因が複雑に組み合わさる発症に至る polygene 系である。我々は膠原病の病因・病態を経時的に観察し、その原因をゲノムレベルで解析するために、膠原病関連の組換え近交系 **MXH/lpr** マウスを作出し、これまで解析を行ってきた(平成 14~16 年度報告書参照)。本年度は引き続き **MXH/lpr** マウスを用いた血管炎感受性遺伝子座の解析を行うとともに、網羅的な新規自己抗体検索法の樹立をこころみた。

### B. 研究方法

#### 1. 新たな組換え近交系系統の作出

膠原病好発系 **MRL/lpr** マウスと膠原病嫌発系 **C3H/lpr** との間の雑種第二世代を出発点に、兄妹交配を 20 世代以上繰り返して新たな組換え近交系 **MXH/lpr** 4 系統を作出した。これら新たに作出された系統について、各種膠原病病態を観察、遺伝学的形質を解析(系統間分布表の作出)し、**QTL** 解析によって感受性遺伝子座を同定する。

#### 2. **AlphaScreen** を用いたプロテオーム網羅的な新規自己抗体の検索

**AlphaScreen** 法は **PerkinElmer** 社により発売されており、生体分子間の相互作用を高感度に、しかも容易に評価できる **assay** 系である。

今回、愛媛大学無細胞生命科学工学研究センターの協力のもと、無細胞蛋白質合成系と **AlphaScreen** 法とを組み合わせ、新規自己抗体を網羅的に、しかも **high-throughput** に検索するシステムの確立を試みた。

#### 3. 組換え近交系間の交配系 **RIX** の作成

昨年度に引き続き、**MXH/lpr** 各系統間の交配系 **RIX** を作成し血管炎感受性遺伝子座の詳細な解析を行っている。

(倫理面に対する配慮)

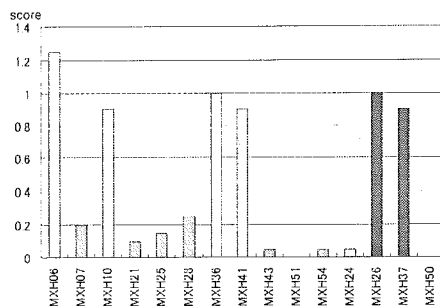
愛媛大学動物実験指針に基づき実験を行った。

### C. 研究結果

#### 1. 血管炎感受性遺伝子座を第 4 染色体に significant level でマップした。

今年度新たな組換え近交系 **MXH/lpr** 4 系統を樹立した(**MXH24, 26, 37, 50**)。このうち、**MXH26, 37** が血管炎好発系であった(図 1)。この結果を加え、**SDP** 表をもとに **MXH/lpr** 15 系統を対象に **QTL** 解析を行ったところ第 4 染色体 **D4Mit4(12.1cM)** に **significant level** で感受性遺伝子座をマップすることができた。

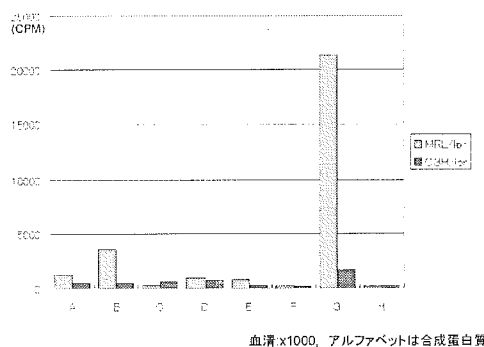
図1 MXH/lpr 15系統の腎血管炎score(5ヶ月齢)



2. AlphaScreen 法と無細胞蛋白質合成系との組合せが新規膠原病関連自己抗体の検索に有用であることが示された。

AlphaScreen 法と無細胞蛋白質合成系を組合せ、MRL/lpr における合成蛋白質特異的な自己抗体の検索を開始した。その結果、MRL/lpr において高値となる特定の蛋白質に対する自己抗体を検出した(図 2)。

図2 AlphaScreen法による自己抗体の検索



#### D. 考察

今回新たに MXH/lpr 4 系統を樹立し、そのうち 2 系統が血管炎好発系であることを見出し、これらを加えた 15 系統の QTL 解析の結果、血管炎の感受性遺伝子座を significant level で第 4 染色体の D4Mit4 にマップした。この locus は、以前 MXH/lpr 11 系統の解析時にも suggestive level でマップされていたものである。今回の結果は、D4Mit4 近傍に血管炎の感受性遺伝子が存在する蓋然性を支持するものであり、また、組換え近交系における系統数の重要性を強く示唆するものである。

AlphaScreen 法と無細胞蛋白質合成系を組み合

わせることにより、MRL/lpr においてこれまで観察されなかったことがない自己抗体を検出した。本法はタンパク質合成、AlphaScreen 法とも自動化が容易であり、これまでに得られたゲノムプロジェクトの成果を用いて、網羅的な膠原病関連新規自己抗体が可能である。今回検出された蛋白質に対する自己抗体は、すでにヒトにおいてある種の自己免疫病態との関連が示唆されており、本法の有用性を支持していると考えられる。現在、さらに多数の蛋白質を対象として自己抗体の検索を行っている。

#### E. 結論

新たに MXH/lpr 4 系統を作出し血管炎病態の解析を行った。新たに作出された 4 系統の内 2 系統が血管炎好発系であり、第 4 染色体に significant level の感受性遺伝子座をマップした。

また、新たに AlphaScreen を用いたプロテオーム網羅的な新規自己抗体の検索を開始した。

[研究協力者]

寺田美穂(愛媛大学医学部病因・病態学講座ゲノム病理学分野)、澤崎 達也、遠藤 弥重太(愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター)

#### G. 研究発表

論文発表

- Inoue A, Hasegawa H, Kohno M, Ito MR, Terada M, Imai T, Yoshie O, Nose M, Fujita S.: Antagonist of fractalkine (CX3CL1) ameliorates the initiation and progression of lupus nephritis in MRL/lpr mice. *Arthritis Rheum* 52: 1522-33, 2005.
- Oishi H, Miyazaki T, Mizuki S, Kamogawa J, Lu L-M, Tsubaki T, Arita N, Ono M, Yamamoto H, Nose M.: Accelerating effect of an MRL gene locus on the severity and onset of arthropathy in DBA/1