

分担研究報告書

炎症疾患治療評価を行うためのモデル動物の解析：
紫外線誘発皮膚炎における好中球由来活性酸素の関与

分担研究者： 荒谷康昭 横浜市立大学木原生物学研究所・助教授

研究要旨：紫外線で誘発される皮膚炎における好中球機能異常の影響を解析した。紫外線をマウスの背部に照射して実験的皮膚炎を誘発させ、皮膚の組織病理像を比較したところ、好中球からの活性酸素産生を欠如するミエロペルオキシダーゼ欠損マウスや NADPH オキシダーゼ欠損マウスの方が、野生型マウスよりも皮膚の炎症が早期に進行した。これらのノックアウトマウスの好中球は、KC に対する走化性と MIP-2 産生量が、野生型好中球よりも高いことがわかった。このような好中球機能異常が、紫外線で誘発される皮膚炎を促進している可能性が示唆された。

A. 研究目的

炎症疾患治療評価を行うためのモデル動物としての、ミエロペルオキシダーゼノックアウトマウス (MPO-KO マウス)、NADPH オキシダーゼノックアウトマウス (CGD マウス)、およびその両酵素の二重欠損マウス (MPO-KO/CGD マウス) の性状解析を行うことを目的とし、紫外線 (UVB) に対する応答性を解析した。

B. 研究方法

実験には 8 10 週令の雌マウスを使用した。MPO-KO マウスと CGD マウスは、C57BL/6 マウスに戻し交配したマウスを用いた。また、MPO-KO/CGD 二重欠損マウスは、MPO-KO マウスと CGD マウスの交配により作製した。マウスは、横浜市立大

学木原生物学研究所動物実験指針に準じて飼育管理した。各マウスの背部に UVB を照射し、組織切片の H&E 染色像および免疫染色像によって炎症の経時的变化を解析した。皮膚患部のケモカイン産生量は、組織破碎液上清を調製して、ELISA 法で測定した。好中球からのケモカイン産生量は、チオグリコレートを腹腔投与し、4 時間後に侵出してきた好中球をフォルボールエステル (PMA) で活性化し、1 時間後の培養上清を ELISA 法で測定した。好中球の *in vivo* ケモカイン走化性は、マウス背部に常法に準じて air pouch をつくり、その中に KC を注入し、2 時間後の pouch 内好中球数を測定した。

C. 研究結果

マウス背部に UVB を照射した際の炎症の経時変化を組織学的に解析した。その結果、好中球の浸潤をともなう炎症は、野生型マウスと比較して MPO-KO マウスの方が早期に起こり、CGD マウスはより早期に、MPO-KO/CGD マウスが最も早期に起こることがわかった。

このように炎症速度に違いが生じる理由を知るために、UVB 照射 48 時間後の皮膚患部の KC 量と MIP-2 量を測定した。その結果、MPO や NADPH オキシダーゼを欠損するノックアウトマウスの方が、野生型マウスよりも MIP-2 産生量が多いことが判明した (図 1)。KC 量に差は認められなかった。MIP-2 の産生源を知るために、腹腔から単離した好中球を PMA で活性化させた際の MIP-2 産生量を測定した。その結果、MPO 欠損好中球も NADPH オキシダーゼ好中球も、野生型好中球よりも有意に多量の MIP-2 を産生することがわかった (図 2)。すなわち、好中球由来の活性酸素は、自身が産生する MIP-2 量を制御していることが示された。次に、KC に対する好中球の *in vivo* 走化性を調べた。マウス背部に作製した air pouch 内に KC を注入し、2 時間後に pouch 内に侵出した好中球数を測定したところ、MPO-KO マウスの方が野生型よりおよそ 2 倍多く、CGD マウスや MPO-KO/CGD マウスでは MPO-KO マウスよりもさらに多くの好中球の侵出が観察された (図 3)。

以上の結果から、好中球が産生する活性酸素は、好中球の KC に対する走化性や

MIP-2 産生能を制御し、このことが UVB 照射を施した際の皮膚炎の発症速度に寄与している可能性が示唆された。

D. 考察

本研究によって、好中球の活性酸素産生異常が、炎症の発症に深く関わっていることが示された。また、その活性酸素は、好中球自身の走化性やケモカイン産生も制御していることが示された。これらの結果によって、活性酸素産生を欠如するマウスが、より早期に皮膚炎を発症するメカニズムの一端が解き明かされたことになり、炎症疾患治療評価を行うためのモデル動物の解析という本研究課題に飛躍的進展を認めた。活性酸素が走化性を制御するメカニズムや、ケモカイン産生を制御するメカニズムをさらに詳細に解析することが、今後の課題として残されている。

E. 結論

好中球からの活性酸素産生を欠如する好中球機能異常マウスは、好中球の走化性やケモカイン産生に異常をきたし、紫外線による皮膚炎の早期発症を起こすことがわかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Komatsu, J., Koyama, H., Maeda, N., and Aratani, Y: Earlier onset of neutrophil-mediated inflammation in the ultraviolet-exposed skin of mice deficient in myeloperoxidase and NADPH oxidase. *Inflamm. Res.* In press.

2. 学会発表

- 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、2005年4月(東京)
- 2) 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, June, 2005
- 3) 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集会、2005年8月(東京)
- 4) 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: *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集会、2005年8月(東京)

- 5) 荒谷康昭: 真菌感染と好中球ミエロペルオキシダーゼ。第49回 日本医真菌学会総会、2005年10月(千葉)
- 6) 荒谷康昭, 倉 文明, 渡辺治雄, 赤川久義, 高野幸枝, 鈴木和男, Nobuyo Maeda, 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, 2005年10月15-16日(福岡)
- 7) Aratani, Y: Role of neutrophil-derived ROS for the ultraviolet-induced skin inflammation. International symposia on therapeutic strategy to the best advantage of collaboration between basic research and clinical research, Tokyo, February, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

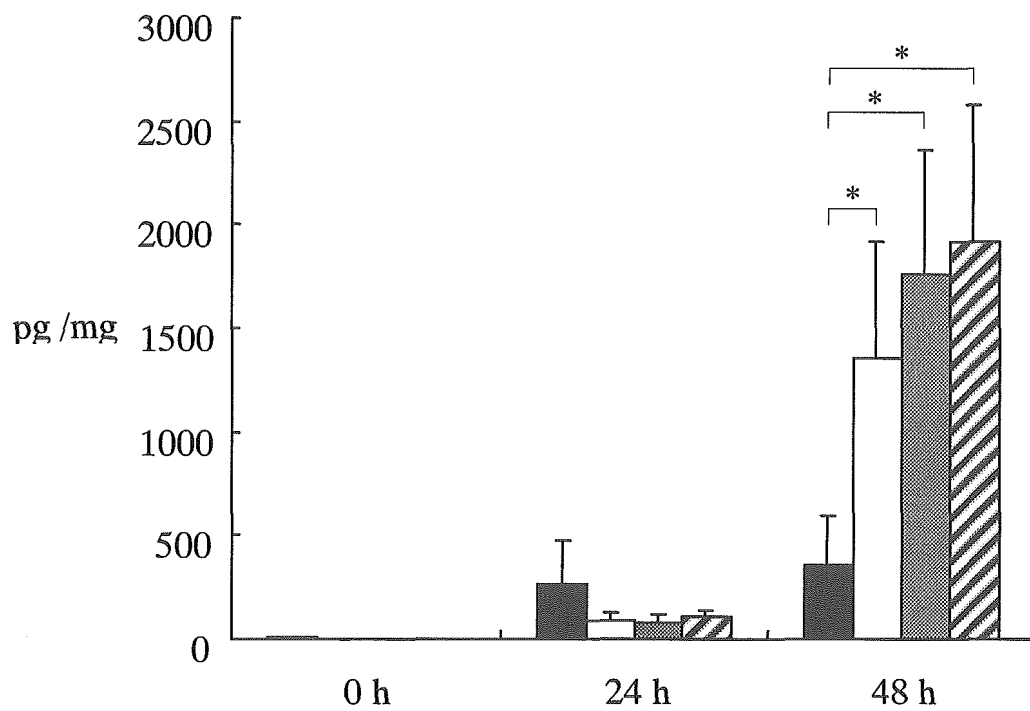


図1 紫外線照射後 24 時間および 48 時間における皮膚患部の MIP-2 量
 黒:野生型、白:MPO-KO、灰:CGD、斜:MPO-KO/CGD. *, $P < 0.05$

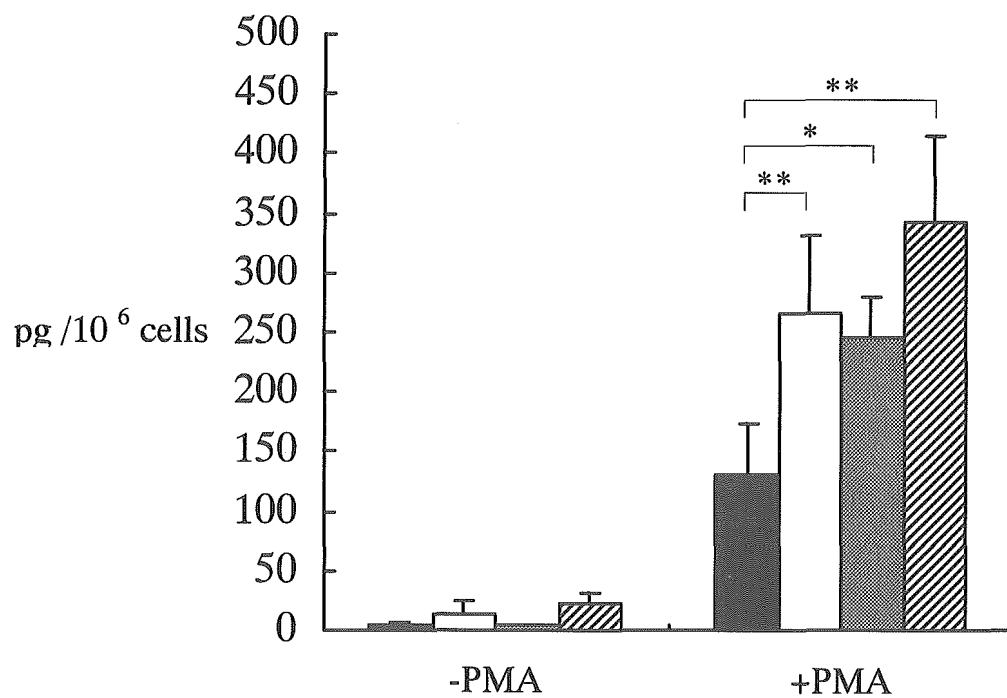


図2 単離好中球からの MIP-2 産生量

黒:野生型、白:MPO-KO、灰:CGD、斜:MPO-KO/CGD.

*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$;

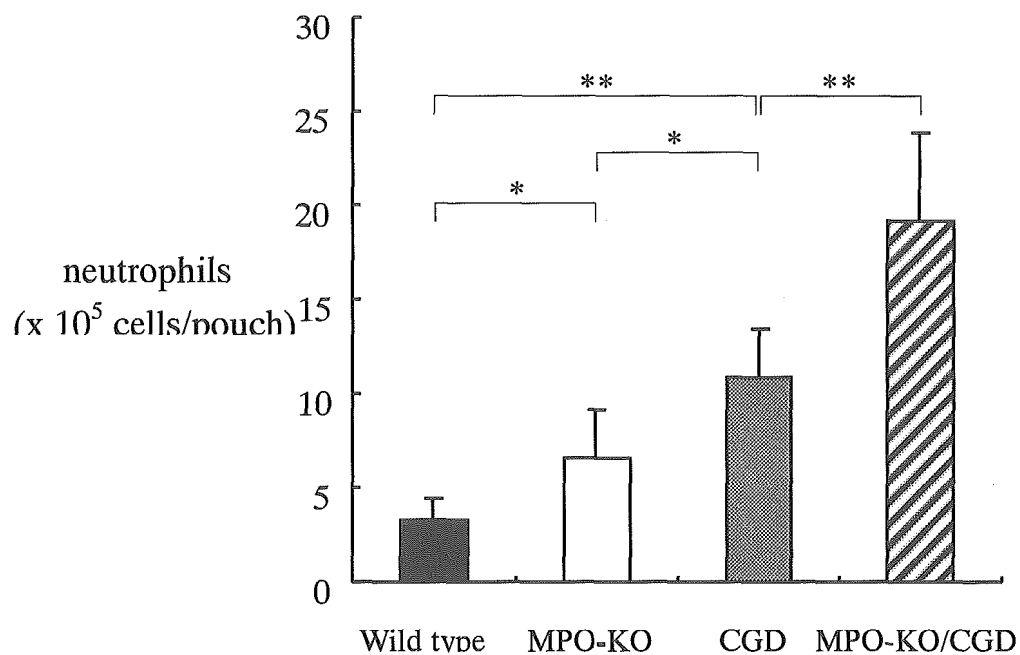


図3 KC に対する好中球の走化性

黒:野生型、白:MPO-KO、灰:CGD、斜:MPO-KO/CGD.

*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$;

量子ドットの多臓器不全診断治療への応用

分担研究者 山本 健二 国立国際医療センター 研究所・副所長

協力研究者 星野 昭芳 国立国際医療センター研究所・流動研究員

協力研究者 真鍋 義則 国立国際医療センター研究所・研究生

協力研究者 藤岡 宏樹 国立国際医療センター研究所・研究生

協力研究者 塩原あまね 国立国際医療センター研究所・研究生

研究要旨：本研究の目的は、量子ドット（半導体ナノ粒子）を用いたナノプローブの開発とその利用による細胞染色、特に血管炎関連抗原について標識した血球成分の動態を生体内で観測する技術を開発することを目的としている。今年度は、特にナノプローブを用いて好中球関連の抗原であるMPOに対する抗体を標識し活性化した好中球を可視化した。

A. 研究目的

半導体ナノ粒子は、強力な蛍光を有する結晶でその大きさは数ナノメートルである。そのため軌道電子が量子サイズの領域にコンパクトに存在することになり、その結果量子サイズ効果によって軌道準位が大きな差を生じ、強力な蛍光を出すことが可能となる。この強い蛍光を利用し従来有機色素で染色していたが、非常に暗くはっきりと可視化できなかった分子も可視化できるようになる。この技術の応用として好中球の炎症関連抗原であるMPO抗原に対し量子ドットで染色し、その細胞内局在、またその好中球の生体内局在性を観測することを目的とする

B. 研究方法

1) 抗MPO抗体の量子ドットタグ：
炎症関連抗原MPOに対する抗MPO抗体に対しアビジン・ビオチンを用い量子ドットを結合させる。その量子ドット結合抗MPO抗体を用いてMPO抗原と抗原抗体反応させることによりMPO抗原を量子ドットで染色することとした。

上記の方法で製造した量子ドットタグ化MPO抗原が正しいか否かをウエスタンブ

ロットにて確認した

2) 活性化好中球の染色：

好中球を *in vitro* 実験において界面活性剤で細胞膜に穴を開けることにより、細胞内に量子ドットタグ化抗MPO抗体の染色を行った。また活性化した好中球は、直接量子ドットタグ化抗MPO抗体の染色を行った。

3) 生体内活性化好中球の動態：

マウス生体内より好中球を取り出し、サイトカインなどで好中球を活性化させるか、あるいは血管炎モデル化マウスを用い、マウス生体内に導入する。その後時間を追ってマウスの状態を観察し、また経時的に腎臓、肺などの臓器の組織切片を前述の量子ドット結合抗MPO抗体を用い染色し、好中球の生体内動態を解析する。

C. 研究結果

1) 好中球における炎症関連抗原MPOの局在性：

非活性化状態にある正常の好中球について量子ドット結合抗MPO抗体によって染色を行い蛍光顕微鏡で観察したが、染色

されていないことが判明した。そこで量子ドット結合抗MPO抗体によって細胞内の染色を行うため界面活性剤 (TritonX) を用いて、好中球の細胞膜に穴を開け、量子ドット結合抗MPO抗体によって染色した結果MPOが非活性化好中球の細胞内に存在することを確認した。

次にサイトカインなどで活性化させた好中球について同様のことを調べた結果、細胞内には、MPOが存在せず、活性化好中球の細胞表面にMPOが存在することが判明した。

2) 血管炎モデル化マウスによる好中球生体内動態:

血管炎モデル化マウスを用い、その好中球を分離し正常マウスに導入する。2時間以内に蛋白尿を出し、腎炎が誘導され、24時間以内に激しい血管炎により耳介の崩壊が誘導される。そのマウスより臓器を摘出し組織切片の解析を行った結果、腎臓の糸球体に活性化された好中球が浸潤していることが、量子ドットタグ化抗MPO抗体の染色により明らかになった。

D. 考察

1. 達成度について

量子ドットタグ化抗MPO抗体の染色により、これまでの有機蛍光色素を使った研究では、追跡が不可能だった。そのひとつの大きな原因は、MPO分子が有機蛍光色素を使った実験にとって十分な量が好中球には、存在しないことであると考えられる。好中球は、mRNAが、それほど多くなく、合成されたMPOを残し新たな細胞内合成量は、少ないと考える。分子数の少なさと、有機蛍光色素の蛍光強度の弱さがこれまで成功しなかった原因であると示唆される。それに対し、量子ドットタグ化抗MPO抗体は、十分な蛍光強度があり今回のような計測に最適であることが判明した。

2. 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

半導体ナノ粒子の可視光観察によって細胞・組織・臓器・生体レベルで解析する事は国際的に極めて重要である。また、この技術および成果を利用して生きた動物で細胞、分子などを生体内で観測する事は、血

管炎など疾病のメカニズムを解析する上に於いても極めて重要である。さらにこの研究成果により、患者の負担を軽減し国民医療のみならず、社会的にも意義が大きくなることを期待する。

3) 今後の展望について

本年度は、量子ドットタグ化抗MPO抗体を用いて血管炎を起こしたマウス生体内における活性化好中球の臓器内局在性について解析可能なシステムを構築した。今後同様のシステムを用いヒト臨床検体を用い疾病の診断、病態の解析、病因の解明、治療法の評価などに役立つシステムを開発する。

E. 結論

以上のように、本研究を通じて、半導体ナノ粒子によって安全に量子ドットタグ化抗MPO抗体を用いて血管炎を起こしたマウス生体内における活性化好中球の臓器内局在性について解析可能なシステムを構築した。

F. 健康危険情報

本研究では現在のところ健康に危険を及ぼす可能性はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hoshino A, Fujioka K, Manabe N, Yamaya S, Goto Y, Yasuhara M, Yamamoto K. Simultaneous Multicolor Detection System of the Single-Molecular Microbial Antigen with Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy. *Microbiol Immunol.* 2005; 49(5): 461-470
- 2) Warner JH, Hoshino A, Yamamoto K, Tilley RD. Water-Soluble Photoluminescent Silicon Quantum Dots *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005; 44(29): 4550-4554.
- 3) Wayne Dawson, Kazuya Fujiwara, Yasuhiro Futamura, Kenji Yamamoto, Gota Kawai. A new paradigm for finding optimal RNA

secondary structures by thermodynamics alone. Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids, in press. 2005

4) Yasuhiro Futamura and Kenji Yamamoto ; Hydrothermal Synthesis of Olygoglycines with Adiabatic Expansion Cooling, Viva Origino, (in press) 2005

5) Tomomasa Goto, Yasuhiro Futamura, Yukio Yamaguchi, Kenji Yamamoto. Condensation Reactions of Amino Acids under Hydrothermal Conditions with Adiabatic Expansion Cooling. Journal of Chemical Engineering of Japan, 38, (4) 295-299, April 2005.

6) Amane Shiohara, Noriyoshi Manabe, Kazumi Omata and Kenji Yamamoto; Novel surface processing with sulfonic acid for quantum dot and its characteristics, Chemical Engineering, (in press), 2005

7) Kenji Yamamoto; Nanotechnology and Trends in Drug Delivery Systems with Self-Assembled Carriers. Biomedical Nanotechnology (Ed. By Neelina H. Malsch) Taylor & Francis. 29-40, 2005

(総説)

1) Yu.I. Dahnovsky, V.D. Krevchik, E.I. Kudryashov, V.G. Mayorov, M.B. Semenov, V.Ch. Zhukovsky K. Yamamoto; One - dimensional quantum dissipative tunneling in structures with quantum dots, UT Rearch Institute Press, 348-360, 2005

2) A.K. Aringazin, Yu.I. Dahnovsky, V.D. Krevchik, M.B. Semenov, A.A., V.A. Veremyev, K.Yamamoto; Two-dimensional tunnel correlations with dissipation, UT Rearch Institute Press 2005,.

3) A.K. Aringazin, Yu.I. Dahnovsky, V.D. Krevchik, M.B. Semenov, A.A., V.A. Veremyev, K. Yamamoto; Two - dimensional tunnel bifurcations with dissipation, UT Rearch Institute Press 2005,

4) Wayne Dawson, Kenji Yamamoto;

Harnessing the biophysical principles of chaperons to process specialized materials for nanotechnology applications, UT Rearch Institute Press, 434-443, 2005,.

5) Kenji Yamamoto ; The fluorescence intensity of the quantum dots in the water depends on the surface processing, UT Rearch Institute Press, 444-450, 2005,.

6) Wayne Dawson , Kazuo Suzuki, Kenji Yamamoto; A Physical Origin for Functional Domain Structure in Nucleic Acids as Evidenced by Cross-linking Entropy: I, UT Rearch Institute Press, 451-492, 2005.

6) Wayne Dawson, Kazuo Suzuki, Kenji Yamamoto ; A Physical Origin for Functional Domain Structure in Nucleic Acids as Evidenced by Cross-linking Entropy: II, UT Rearch Institute Press, 493-532, 2005.

7) 星野昭芳、山本健二 量子ドット蛍光を用いた細菌毒素の1分子抗原抗体反応検出システム BioClinica2005:20(1):23-262.

8) 山本健二、山屋俊一、「一般細菌以外の培養同定困難な菌」臨床検査データブック2005—2006 高久史監修、医学書院(2005)

. 学会発表
(国内学会)
なし
(国際学会)
なし

Ⅲ. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1) 特許 なし
2) その他 なし

MPO-ANCA および好中球機能異常を示す血管炎動物モデルの検討

分担研究者：大川原明子 国立感染症研究所 生物活性物質部 主任研究官

研究要旨：本研究では *Candida albicans* released a water-soluble polysaccharide fraction (CAWS) の腹腔内投与によって心動脈炎を誘発するモデルを用い解析を行った。CAWS 投与後初期に骨髄からの移動によって末梢好中球が増加、活性化すること、また炎症性サイトカイン、ケモカインが産生されることを既に報告した。本年度は、*vitro* の系で CAWS 刺激によって好中球が産生するサイトカインについて検討した。また、ICAM-1 を指標として 心大動脈局所における初期の傷害の可能性について、さらに、好中球活性化の原因のひとつとして補体活性化が関与することを明らかにした。

A. 研究目的

炎症関連細胞は外来異物などを排除する生体防御機能を担っているが、その過程で血管傷害を引き起こすことも考えられる。これまで、血管炎発症にかかわる因子としては、ANCA および、いくつかの自己抗体、IL-8 や TNF- α などの炎症性サイトカイン、内皮細胞の活性化、接着分子、血管内膜・中膜・外膜あるいは細胞外マトリックスの反応系などが考えられており、それらの因子が連鎖して血管炎発症の引き金になっていると推測される。一方、血管炎の患者では、末梢好中球の活性化が認められ、病態の推移と関連していることが報告されている。たとえば血管炎患者では血中に好中球抗体 ANCA (anti-neutrophil cytoplasmic antibody) が上昇することや、好中球、好中球抗体が血管炎に関与していることが明らかになってきている。

一方、血管炎の治療や、病因を解析する上で、モデルマウスを用いた研究は必須である。加齢に伴って腎炎や血管炎を発症する NZB/WF1、MRL/lpr、SCG/Kj マウスなど血管炎モデルマウスを用いて血管炎発症に関与する MPO-ANCA

や好中球機能について解析することは有用である。*Candida albicans* released a water-soluble polysaccharide fraction (CAWS) 接種後の病理所見の観察から、血管炎発症局所へのマクロファージ、好中球、リンパ球等の炎症細胞の集積が観察される。しかし、これらの細胞がどのように関与しているかについては不明な点も多い。

本研究では、CAWS 投与によって心動脈炎を発症するモデルマウスを用いて、活性化好中球、炎症性サイトカイン等の産生と血管炎発症との関係について基礎的な検討を行った。

B. 研究方法

1) マウス

C57BL/6N マウス、6W、♂を SPF 環境下飼育し用いた。

2) CAWS の調整と投与

C. albicans IFO 1385 を完全合成培地で培養し、その培養上清より CAWS を精製した。PBS で 20 mg/ml に調整した CAWS をオートクレーブし、マウスに腹腔内投与 (4 mg/マウス) した。また、*vitro* の系では、CAWS 1mg/ml

を腹腔滲出好中球 (5×10^6 cells/ml) に作用させ、好中球が産生するサイトカインについて解析を行った。

3) 心大動脈局所における ICAM-1 の発現、血中可溶性 ICAM-1 の経時的変化

CAWS 投与 16 hr 後に心大動脈を分離し、ICAM-1 の発現を real time PCR で定量した。一方、CAWS 投与直後から血中の可溶性 ICAM-1 を ELISA 法で経時的に定量した。

4) 補体活性化の検討

CAWS を投与したマウス心臓より EDTA 採血し、血漿を分離した。サンドイッチ ELISA 法、ウェスタンブロッティング法によって、complement 3 (C3) を検出、定量し補体活性化の指標とした。

(倫理面への配慮)

動物使用に際しては、飼育、薬剤投与、屠殺などすべての過程において動物愛護の精神を遵守し実験を行った。

C. 研究結果

昨年、CAWS 4 mg/マウス 投与後、血中に IL-1 β 、IL-6、IL-10 が産生されることを明らかにした。これらのサイトカインを好中球が産生する可能性を明らかにするため、CAWS 1 mg/ml を腹腔滲出好中球に作用させたところ、IL-6 の産生は CAWS によって亢進したが IL-1 β 、IL-10 は CAWS の存在とは無関係に好中球が産生していることが示された (図 1 a-c)。

心大動脈局所の内皮の傷害性について ICAM-1 発現を指標にして検討をしたところ、CAWS 投与 16 時間後には有意な上昇を認めた (図 2 a)。また、血中の可溶性 ICAM-1 も CAWS 投与後、時間の経過とともに上昇した (図 2 b)。一方、好中球活性化の原因のひとつとして補体の活性化について検討したが、

CAWS 投与直後からその活性化が認められた (図 3 a, b)。

D. 考察

CAWS 投与初期に活性化された末梢好中球は炎症性サイトカインを産生すること、また CAWS は IL-6 の産生を直接亢進することが示された。また ICAM-1 を指標にして行った組織傷害の解析から、CAWS 投与初期の段階で、血管内皮傷害の可能性が示唆された。CAWS 投与初期のこの知見は心動脈炎にいたる過程と思われる。一方、*vitro* の系でヒト好中球に CAWS を作用させることによって補体のレクチン経路が活性化されるという知見が既に得られているが (未刊行データ)、マウスの *vivo* の系でも補体活性化が認められたことから、好中球の活性化の原因のひとつが補体の活性化であることが示唆された。補体活性化を阻害することによる好中球活性化関連血管炎の改善が示唆された。

E. 結論

昨年度、CAWS 投与直後における末梢好中球の増加、活性化、炎症性サイトカインおよびケモカインの産生について報告したが、今年度、心大動脈局所における組織傷害性について明らかにした。さらに好中球活性化の原因のひとつとして補体の活性化の可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表 (17 年度の本研究に関するもののみ)

1. 論文発表

- 1) Yoshitomo Hamano, Sachiko Hirose, Kazuyuki Tsukamoto, Masaaki Abe, Guo Dong Sun, Danqing Zhang, Hiroaki Fujii,

Shuji Matsuoka, Masumi Tanaka, Akiko Ishida-Okawara, Hitoshi Tachikawa, Hiroyuki Nishimura, Kazuhiro Tokunaka, Okio Hino and Kazuo Suzuki. Genetic dissection of vasculitis, MPO-ANCA production and related traits in SCG/Kj mice. *J. Immunol.* In press 2005.

2. 学会発表

- 1) Ito-Ihara T, Ishida-Okawara A, Liu N, Hiasa S, Saiga K, Nemoto K, Kita K, Muso e, Suzuki K, and Ono T. SCG/kj mice, a model of ANCA-associated crescentic glomerulonephritis, develop crescent formation through neutrophil activation, tissue factor expression and fibrin precipitation. International Symposium on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research Feb, 2005, Tokyo
- 2) Takahashi K, Oharaseki T, Naoe S, Miura N, Ohno N, Murayama K, Okawara A, Suzuki K. The effect of human immunoglobulin (h-IG) in mice vasculitis model caused by CAWS International Symposium on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research Feb, 2005, Tokyo
- 3) Yumura W, Itabashi M, Ishida-Okawara A, Yamashita J, Kaneshiro Y, Nihei H, Suzuki K. A Novel Model Mouse of MPO-ANCA-Associated Glomerulonephritis with Increased Neutrophil Contribution. International Symposium on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research Feb, 2005, Tokyo
- 4) 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 血管炎発症にかかわる CD69 分子と活性化好中球 DHD 研究会、2005 年 6 月、香川

- 5) Uemura Kazuhide, Hiasa Shunsuke, Liu Ning, Saiga Kan, Nemoto Kyuichi, Muso Eri, Kawasaki Toshisuke, Ishida-Okawara Akiko, Suzuki Kazuo, Ono Takahiko Deposition of mannan-binding protein in glomeruli of SCG/kj mice model of ANCA-associated crescentic glomerulonephritis 日本腎臓学会総会、2005 年 6 月、横浜
- 6) Kazuo Suzuki, Ken Murayama, Tomokazu Nagao, Toshiaki Oharaseki1, Akihiro Hasegawa, Akiko Ishida-Okawara, Noriko N. Miura, Naohide Watanabe, Makoto Handa, Kei Takahashi, Naohito Ohno, Haruyuki Minamitani, Toshinori Nakayama, Takao Arai Contribution of CD69 to the development of coronary arteritis induced with a vasculitis Inducer Candida albicans water soluble fraction. 13th Gordon Research Conference, 2005, June, Connecticut, USA
- 7) 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, 2005 June, Heidelberg, German
- 8) 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, 2005, June, Heidelberg, German.
- 9) Akiko Ishida-Okawara, Noriko Nagi-Miura, Toshiaki Oharaseki, Naohito Ohno, Kei Takahashi, Haruki Okamura, Peter A. Ward, Kazuo Suzuki Neutrophil activation as in initial step with CAWS in mouse. 12th International ANCA workshop, 2005. June, Heidelberg, German.
- 10) Kazuo Suzuki, Ken Murayama, Tomokazu Nagao, Toshiaki Oharaseki, Akihiro Hasegawa, Akiko Ishida-Okawara, Noriko N. Miura, Naohide Watanabe, Makoto Handa, Kei Takahashi, Naohito Ohno, Haruyuki Minamitani, Toshinori Nakayama, Takao Arai Contribution of CD69 to the development of coronary aeteritis induced with a vasculitis Inducer Candida albicans water soluble fraction 12th International ANCA workshop, 2005, June, Heidelberg, German
- 11) Akiyoshi Hoshino, Tomokazu Nagao, Ken Murayama, Akiko Ishida-Okawara, Toshiko Ito-Ihara, Kazuko Uno, Eri Muso, Noriko Nagi-Miura, Naohito Ohno, Shiro Naoe, Kazuhiro Tokunaka, Masato Yasuhara, Kenji Yamamoto and Kazuo 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, 2005, June, Heidelberg, German
- 12) 猪原登志子、大川原明子、劉寧、日浅俊介、雑賀寛、根本久一、武曾恵理、鈴木和男、北徹、小野孝彦 ANCA 関連半月体形成性糸球体腎炎モデル SCG/Kj マウスにおける好中球活性化と凝固系活性化を介した半月体形成機序第 48 回日本腎臓学会学術総会 2005 年 6 月、横浜
- 13) 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状動脈炎の発症への 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、 2005 年 6 月、高松
- 14) 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、2005 年 7 月、京都
- 15) 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、 2005 年 7 月、京都
- 16) 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、2005 年 8 月、東京
- 17) 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、2005 年 8 月、東京
- 18) 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、2005 年 8 月、東京
- 19) 猪原登志子、大川原明子、劉 寧、日浅俊介、雑賀寛、根本久一、武曾恵理、鈴木和男、北徹、小野孝彦 SCG/Kj マウスにおける好中球活性化と糸球体内凝固の進行 第 17 回 腎とフリーラジカル研究会、2005 年 9 月、岡山
- 20) 荒谷康昭、倉 文明、渡辺治雄、赤川久義、高野幸枝、鈴木和男、大川原明子、Nobuyo Maeda、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 2005 年 10 月、福岡
- 21) 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 β マンノース残基の影響 第 11 回 MPO 研究会 2005 年 10 月、福岡
- 22) 猪原登志子、大川原明子、劉寧、日浅俊介、雑賀寛、根本久一、北徹、武曾恵理、鈴木和男、小野孝彦 ANCA 関連半月体形成性糸球体腎炎モデル SCG/Kj マウスにおける好中球 MPO 放出と凝固系活性化を介した半月体形成機序 第 11 回 MPO 研究会 2005 年 10 月、福岡
- 23) 太刀川仁、大川原明子、徳中一寛、相澤義房、鈴木和男 MPO-ANCA 関連半月体形成腎炎モデルマウス (SCG/Kj マウス) における Th バランスの検討 第 11 回 MPO 研究会 2005 年 10 月、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 2005 年 10 月、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 2005 年 10 月、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 2005 年 10 月、福岡
- 27) 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 2005 年 10 月、福岡
- 28) 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ジング学会 2005 年 10 月、福岡
- 29) 荒谷康昭、倉 文明、渡辺治雄、赤川久義、高野幸枝、鈴木和男、大川原明子、Nobuyo Maeda、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 2005 年

10月、福岡

- 30) 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, Oct, Soul
- 31) 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 2005年12月 横浜
- 32) 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 第35回免疫学会 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 2005年12月 横浜
- 33) 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關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 2005年12月

横浜

- 34) 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 2005年12月 横浜
- 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と好中球の系球体内皮細胞への作用 第28回分子生物学会 2005年12月、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 活性化好中球關与の肺血管内皮細胞の機能解析 第28回分子生物学会 2005年12月、福岡

H. 知的財産權の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

プロピルチオウラシルによる MPO-ANCA 産生のメカニズム

分担研究者 鈴木章一 長崎大学 熱帯医学研究所 助手

研究要旨: 抗甲状腺剤であるプロピルチオウラシル(PTU)投与した患者における(MPO-ANCA 産生機序)に関し、PTU の樹状細胞の分化に及ぼす影響を、マウス骨髄細胞培養系を用いて解析した。PTU の治療を受けた患者では pDC と CD11b(low)DC の数が減少した。CD11b(high)DC の割合が増加している可能性が考えら、CD11b(high)DC の割合が増加により自己抗体が産生されやすくなり、その結果、CD11b(high)DC の割合の増加が PTU による MPO-ANCA 産生の引き金となっている可能性が考えられる。

A. 研究目的

抗甲状腺剤であるプロピルチオウラシル(PTU)は、Graves' disease の治療薬として使用されている。PTU を投与した患者において、MPO に対する自己抗体(MPO-ANCA) の産生がしばしば観察されているが、この産生機序に関しては全く明らかにされていない。自己抗体の産生には樹状細胞(DC)が深く関与していることが知られているので、本研究では PTU が樹状細胞の分化に及ぼす影響を、マウス骨髄細胞培養系を用いて解析した。

B. 研究方法

1) PTU が Flt-3 ligand による DC の分化に及ぼす影響

3種の DC サブセット(pDC、CD11b(low)、CD11b(high)) が同時に産生される Flt-3ligand を用いた骨髄細胞培養系を使用した。

2) PTU が GM-CSF による DC の分化に及ぼす影響

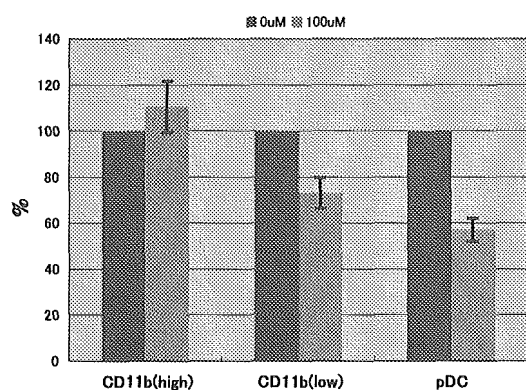
CD11b(high)DC のみ産生される GM-CSF を用いた骨髄細胞培養系を使用した。

C. 研究結果

1. PTU が Flt-3 ligand による DC の分化に及ぼす影響

先ず最初に、3種の DC サブセット(pDC、CD11b(low)、CD11b(high))が同時に産生される Flt-3ligand を用いた骨髄細胞培養系を使用した。図に示したように、PTU (100uM) を培養液に添加した場合、pDC と CD11b(low)DC はそれぞれ、PTU 非存在下で産生された数の 57%と 73%までしか産生されなかった。一方、CD11b(high) DC は PTU を添加しても非存在下の場合と同様に産生された。この結果より PTU は Flt-3 ligand を用い

た培養系における pDC と CD11b(low) DC の分化を抑制することが明らかになった。



2. PTU が GM-CSF による DC の分化に及ぼす影響

次に CD11b(high)DC のみ産生される GM-CSF を用いた骨髓細胞培養系を使用した。PTU 存在下で産生された DC の数は非存在下で産生された数とほぼ同じであった。この結果より PTU は GM-CSF を用いた培養系においても CD11b(high)DC の分化を阻害しないことが明らかになった。

D. 考察

本研究により、PTU は培養系で観察される三種の DC サブセットうち、pDC と CD11b(low) DC の分化を選択的に阻害することが明らかになった。DC の分化は転写因子 IRF-4 と IRF-8 によって制御されており、pDC と CD11b(low)DC の分化には IRF-8 が、CD11b(high)DC の分化には IRF-4 が必要であることが報告されている。今回の結果から PTU は IRF-8 に依存した分化を選択的に阻害すると考えられる。PTU は抗酸化剤であること、抗酸化剤は STAT3 の活性化を抑制するこ

と、STAT3 は IRF-8 遺伝子の転写を活性化することが示唆されていることから、PTU は STAT3 の活性化を抑えることにより pDC と CD11b(low)DC の分化を抑制するのかもしれない。また、本研究成果は、PTU は生体内でも DC の分化を抑制する可能性を示しており、すなわち PTU の治療を受けた患者では pDC と CD11b(low)DC の数が減少し、この結果、CD11b(high)DC の割合が増加している可能性が考えられる。CD11b(high)DC の割合が増加すると自己抗体が産生されやすくなることが示唆されているので、CD11b(high)DC の割合の増加が PTU による MPO-ANCA 産生の引き金となっている可能性が考えられる。

E. 結論

抗甲状腺剤であるプロピルチオウラシル (PTU) 投与した患者における (MPO-ANCA 産生機序に関し、PTU の樹状細胞の分化に及ぼす影響を、マウス骨髓細胞培養系を用いて解析した。PTU の治療を受けた患者では pDC と CD11b(low)DC の数が減少した。CD11b(high)DC の割合が増加している可能性が考えら、CD11b(high)DC の割合が増加により自己抗体が産生されやすくなり、その結果、CD11b(high)DC の割合の増加が PTU による MPO-ANCA 産生の引き金となっている可能性が考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

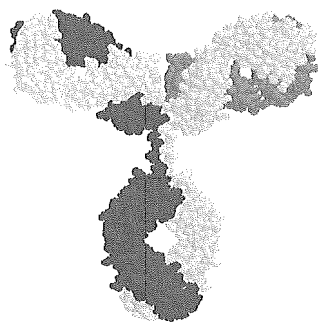
なし

3. その他

なし

**International Symposia on Therapeutic
Strategy to the Best Advantage of
Collaboration between Basic Research and
Clinical Research**

「安全なガンマグロブリン製剤開発—人工ガンマグロブリン」



**Tuesday February 7, 2006
10:00-18:30**

**Conference Hall in NIID
国立感染症研究所・共用第一会議室**

Organizers:

Kazuo Suzuki (NIID, Tokyo)

Hiroshi Hashimoto (Juntendo Univ., Tokyo)

プログラム

10:00 I. Opening

1. 鈴木和男(国立感染症研究所)
人工グロブリンの必要性
2. 植村展生(厚生労働省血液対策課企画官)
我が国の血液製剤の供給と法規制

10:20 II. Epidemiology

座長: 稲葉裕(順天堂大学医学部)、山崎力(東京大学 クリニカルバイオインフォマティクス研究ユニット)

1. 藤元昭一、布井博幸 (宮崎大学医学部)
Incidence of ANCA-associated Primary Renal Vasculitis in Miyazaki Prefecture: The first population-based, retrospective Epidemiological survey in Japan
2. 井関邦敏 (琉球大学院学部附属病院血液浄化療法部)
沖縄県におけるPVCの頻度および発症率調査
3. R. Watts (Norfolk & Norwich Univ. Ipswich, UK)
Epidemiology of Vasculitis – European studies
4. D. Scott (Norfolk & Norwich Univ. Norwich, UK)
Epidemiology Studies in Systemic Vasculitis in Norfolk, UK

11:40 III. Vasculitis in Lung

座長: 相澤義房(新潟大学大学院医歯総合研究科・循環器学分野)、深津敦司(京都大学医学部付属病院・腎臓内科)

1. 野津朋子(国立感染症研究所、東京女子医大)、近藤光子(東京女子医大)
間質性肺炎におけるANCA陽性例のPrevalenceと病態
2. D. Jayne (Addenbrooke's Hospital, Cambridge Univ., UK)
Association of ANCA vasculitis with pulmonary fibrosis and dementia

12:20 昼食

13:00 IV. Therapy (Clinical Trial of IVIg for RPGN etc.)

座長: 武曾恵理(財団法人田附興風会北野病院医学研究所・腎臓内科)、岡崎富男(広島市民病院)

1. 武曾恵理(財団法人田附興風会北野病院医学研究所・腎臓内科)
Clinical Trial of IVIg therapy in MPO-ANCA related microscopic polyangiitis (MPA) with rapidly progressive glomerulonephritis (RPGN)
2. 佐地勉(東邦大学医療センター大森病院小児科)
急性期川崎病に対する免疫グロブリンの酸化ストレス抑制効果
3. 今井圓裕(大阪大学大学院)
An ANCA associated nephritis induced by propylthiouracil
4. 山縣邦弘(筑波大学付属病院・腎臓内科)
Infectious complications in ANCA associated vasculitis; benefits of high-dose intravenous immunoglobulin treatment
5. 田村直人(順天堂大学・膠原病内科)
Rituximabが有効であった難治性Wegener肉芽腫症の2症例
6. 有村義宏(杏林大学・第一内科)
MPO-ANCA関連血管炎に於ける肺線維症と肺胞出血の関連についての検討

14:35 休憩

14:50 V. Pathology, Clinical Research and Model Mice-1

座長: 直江史郎 (東邦大学付属大橋病院)、能勢真人 (愛媛大学)

1. F. Ferrario (Milano Univ. School of Med., Milano)

Morphological features in ANCA-Associated vasculitis

2. 高橋啓 (東邦大学)

CAWS誘発マウス血管炎モデルにおける合成免疫グロブリン(SyIG)の血管炎抑制効果

3. 大野尚仁 (東京薬科大学)

***Candida albicans*培養条件とCAWSの血管炎, 急性致死活性の関連性について**

4. 大川原 明子 (国立感染症研究所)

Activation of neutrophils in the initial step of arteritis induction by CAWS

5. 猪原登志子 (財団法人田附興風会北野病院医学研究所・腎臓内科)

ANCA関連血管炎症候群におけるIL-12, IL-23, IL-18の動態

16:20 VI. Pathology, Clinical Research and Model Mice-2

座長: 大野尚仁 (東京薬科大学)、宇野賀津子 (ルイバストゥール医学研究センター基礎研究部インターフェロン・生体防御研究室)

6. 小野孝彦 (静岡県立大学・病態薬学)

ANCA関連腎炎モデルSCG/KJマウスにおける腎病変と肺血管病変の関連

7. 湯村和子 (東京女子医科大学・第4内科)

ANCA関連腎炎モデルマウスの発症機序の解析

8. 小林茂人 (順天堂大学越谷病院)

Effect of immune complexes in serum from patients with rheumatoid vasculitis on the expression of cell adhesion molecules on polymorphonuclear cells.

9. 山本健二、星野昭芳 (国立国際医療センター研究所)

Usage of Quantum dots for the evaluation of vasculitis

10. 山西裕司 (広島市立広島市民病院)

血管炎の診断および治療におけるnMPO-ANCAの有用性—MPO-ANCAとnMPO-ANCAの解離について—

11. 荒谷康昭 (横浜市立大学木原生物学研究所)

紫外線誘発皮膚炎における好中球由来活性酸素の関与

17:50 VII. Synthetic IVIg and Pharmacogenetics-Specific Genes

座長: 亀岡洋祐 (医薬基盤研究所)、荒谷康昭 (横浜市立大学木原生物学研究所)

1. 古谷昌弘 (積水化学工業 開発研究所)

人工ポリクローナル免疫グロブリン

2. 野島博 (大阪大学 微生物病研究所)

血管炎患者の血液細胞で特異的に発現亢進している遺伝子群の包括的単離

18:30 Closing Remarks 仁保喜之 (千早病院、福岡)

18:45 懇親会