

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業：政策創薬総合研究

血管炎治療のための人工ポリクローナル  
グロブリン製剤の開発と安全性確保  
に関する研究

(H18-創薬-一般-020)

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

鈴木 和 男

平成20（2008）年3月

血管炎治療のための人工ポリクローナルグロブリン製剤の開発と  
安全性確保に関する研究

主任研究者：所属施設：国立感染症研究所 科学技術特別研究員

氏 名：鈴木和男

分担研究者

所属施設：（財）田附興風会医学研究所北野病院 副所長

氏 名：武曾恵理

所属施設：順天堂大学附属順天堂越谷病院 准教授

氏 名：小林茂人

所属施設：新潟大学 教授、副病院長

氏 名：相澤義房

所属施設：東邦大学 教授

氏 名：佐地 勉

所属施設：大阪大学 教授

氏 名：今井圓裕

所属施設：自治医科大学 教授

氏 名：湯村和子

所属施設：筑波大学 教授

氏 名：山縣邦弘

所属施設：宮崎大学 教授

氏 名：布井博幸

所属施設：東京薬科大学 教授

氏 名：大野尚仁

所属施設：東邦大学 教授

氏 名：高橋 啓

所属施設：横浜市立大学 教授

氏 名：荒谷康昭

所属施設：（独）医薬基盤研究所 主任研究員

氏 名：亀岡洋介

所属施設：大阪大学 教授

氏 名：野島 博

所属施設：国立国際医療センター研究所 国際臨床センター センター長

氏 名：山本健二

所属施設：（財）ルイ・パストゥール医学研究センター 室長

氏 名：宇野賀津子

所属施設：国立感染症研究所 室長

氏 名：大島正道

所属施設：東京大学医学部附属病院 助教

氏 名：平橋淳一

所属施設：千葉大学 特任講師

氏 名：長尾朋和

## 目 次

I. 総括研究報告	
血管炎治療のための人工ポリクローナルグロブリン製剤の開発と安全性確保に関する研究 鈴木和男	1
II. 分担研究報告	
1. 基礎班	
1)人工免疫グロブリン合成に関する研究 ポリクローナル人工ガンマグロブリンを校正するクローンの多様性の検討 亀岡洋祐、大島正道	11
2)免疫グロブリンの In vitro での評価法の検討 鈴木和男、大野尚仁、宇野賀津子、山本健二、河内正治、長尾朋和	17
3)MPO-ANCA 腎炎のサイトカイン・ケモカイン動態：Bio-Plex 法による網羅的解析 宇野賀津子	23
2. モデル動物によるヒト型免疫グロブリンの治療効果	
1)系統的血管炎誘発モデルにおける遠隔期病変の病理組織学的検討 高橋 啓	27
2)自己免疫性心筋炎における免疫グロブリンおよび融合蛋白治療の有効性に関する研究 相澤義房	29
3. 臨床班	
1) MPO-ANCA 陽性顕微鏡的多発血管炎 (MPA) に伴う急速進行性糸球体腎炎 (RPGN) への IVIg 治療の有効性の検討に用いる腎病理組織パラメーターの標準化の試み 武曾恵理	31
2)急性期川崎病に対する静注用ガンマグロブリン製剤の大規模使用成績調査 (Post Marketing Surveillance : PMS) の最終報告からみた安全性と有効性 佐地 勉	37
3)膠原病治療法に関する研究：皮膚型結節性多発動脈炎 (PN) に対するガンマグロブリン 大量療法治療について 小林茂人	41
4)血管炎・腎炎の免疫グロブリンの治療に関する研究:免疫グロブリン大量療法の臨床的試み 今井圓裕	47
5)急速に進行する MPO-ANCA 関連腎炎における $\gamma$ グロブリン治療介入時期の検討 湯村和子	49
6)大量 $\gamma$ グロブリン療法が有効であった PR3-ANCA 陽性、全身性エリテマトーデスの 1 例 山縣邦弘	51
7)宮崎地区における ANCA 関連腎血管炎の疫学 布井博幸	55
4. モデルマウスの誘導に関する基礎的検討および評価法の開発	
1) <i>Candida albicans</i> 細胞壁多糖の構造と活性の培養環境による変化 大野尚仁	61
2)自己免疫疾患患者の血液細胞における遺伝子発現解析 野島 博	69
3)炎症性疾患発症における好中球機能異常の影響に関する研究 荒谷康昭	73
4)好中球接着因子 Mac-1 の血管炎における機能の解析 平橋淳一	77
III. 公開シンポジウム等資料	81
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	89
V. 研究成果の刊行物・別刷 (主要のみ)	95

## 血管炎治療のための人工ポリクローナルグロブリン製剤の開発と 安全性確保に関する研究

主任研究者：鈴木和男 国立感染症研究所 科学技術特別研究員

研究要旨：大量免疫グロブリン製剤（IVIg）による治療法は、重症感染症や川崎病の治療として使用されている。また、高齢者に発症し、近年増加している自己免疫疾患に、より有効な免疫補助療法としてその適応拡大が検討されはじめている。血管炎である川崎病の治療には、IVIg が標準化療法として認可されていることや他の疾患への免疫グロブリンの適応拡大から、その需要が増加している。この需要の増加に加え、血液製剤の安全性や医療経済の点からも、人工化することが今日的急務となっている。そこで、本研究では、免疫グロブリンを人工化することを目的とし、これまでに血管炎モデルマウス（川崎病、腎炎）開発とそれに有効なマウス型人工免疫グロブリンを完成させ、また、ヒト型に特化した人工型ガンマグロブリンのプロトタイプの前製にも成功した。本年度は、臨床応用に向けた *in vitro* での体外診断法の開発を推進した。また、本研究は、社会的にも注目されはじめている（日経2月11日付け）。

### A. 研究目的

高度高齢社会に入ったわが国においては、加齢によって増加する重症感染症、自己免疫疾患、血管炎、リウマチなどの難治性疾患への初期治療として免疫グロブリン製剤治療の必要性が増している。特に、難病の治療に使用されているステロイドパルス治療は、高齢者には危険性が高いことから、免疫グロブリン製剤大量療法（IVIg）の有効性が報告されてきている。このように、IVIg 治療への関心が高まっているが、感染症リスク・安全性確保や高額治療のため、免疫グロブリンの人工化が望まれている。そこで、本研究では、まず、マウス脾臓細胞の mRNA のライブラリーからマウス型人工 Fv 抗体を作製する系を構築し、人工ガンマグロブリンを開発してきた。これを基にし、人工 IVIg 治療用のプロトタイプとしてマウス型を完成させた。マウス型プロトタイプの治療実験には、われわれが開発したモデルマウス（3種類）を用いて有効性を確認してきた。あわせて、致死性の劇症型心筋炎の疾患モデルも作製した。すなわち、天然型 IVIg（ヒト）の安全性をカバーする治療法およびサイトカイン結合免疫グロブリン

として人工型を作製することに成功した。

一方、急性期川崎病およびそれと同じプロトタイプにより、血管炎・腎炎における IVIg 治療による臨床研究も好成績を得て報告した。（*Nephron Clin Pract.* 102:c35-c42, 2005）。

これらの成果から、最終目標であるヒト型に特化した人工免疫グロブリン（Sy-huPFv）を調製するとともに、動物モデルによって、Sy-huPFv の治療効果を検討してきた。本年度は、Sy-huPFv の臨床応用に向けて、血管炎、腎炎、急性期川崎病における IVIg の *in vitro* での体外診断法の開発をめざした。*in vitro* での評価法の理論的裏づけをおこない、臨床評価に利用できる体外診断法として開発・発展させる。特に、anti-MPO 抗体が糸球体血管内皮細胞への作用、Bio-Plex 法による多項目のサイトカイン・ケモカインの評価系およびヒト末梢血リンパ球の増殖能、単球の安定化、好中球脱顆粒、活性酸素産生をはじめとする評価系、血管炎、腎炎、劇症型心筋炎のモデルマウスでの *in vitro* での評価法も平行し検証する。

さらに、臨床探索試験も含め臨床応用の準備を開始するとともに、人工免疫グロブリン

の安全性の向上についても臨床サイドからの動物実験のバックアップをする。

## B. 研究方法

### 1. 基礎分科会

#### 1) Sy-huPFv の合成と発現ベクターライブラリーの検定

ヒト抗体 $\gamma$ 鎖定常領域特異的プライマーを用いた逆転写酵素反応によって $\gamma$ 鎖 cDNA を合成した。これを鋳型として抗体特異的プライマー混合物を用いる PCR によってヒト VH 及び VL 抗体遺伝子を調製した。形質転換体の混合物を LB 培地にて 37°C で培養・精製した。精製した合成たんぱく質は可溶化に困難性があり、種々の可溶化剤を検討した。また、B-1 における形質転換体の一部を LB 寒天培地にプレーティングし、無作為に選ばれた 384 クローンの遺伝子の配列を分析した。

#### 2) 作用機序の解析法の検討

①免疫細胞への作用：本剤開発のためには様々な課題があり、その開発のためのツールとしての *in vivo*, *in vitro* 評価系の開発について検討した。*In vitro* での評価系では、ヒト末梢血リンパ球の増殖能、単球の安定化、好中球脱顆粒、活性酸素産生をはじめとする評価系を構築した。

②MPO-ANCA の直接的作用による糸球体血管内皮細胞の活性化：糸球体血管内皮初代培養細胞 (mGEC) に対して rabbit polyclonal anti-mouse recombinant MPO IgG (anti-rmMPO) を処理し、そのときの接着分子、サイトカイン、ケモカインの発現をリアルタイム RT-PCR、ELISA、Bioplex を用いて解析した。

④免疫グロブリンの血管内皮細胞への作用解析：免疫グロブリンの *in vitro* での評価系を確立するため、マウス血管内皮細胞樹立株 MS-1 細胞を用いて TNF- $\alpha$  による接着分子 VCAM, E-selectin, ICAM-1 の発現を検討した。

#### 3) モデルマウスおよび評価系の検討

①CAWS 誘導冠状動脈炎：Candida albicans Water Soluble fractions (CAWS) によるマウス血管炎誘発モデルに対して、血管炎惹起後、長期生存させたときの動脈変化を観察した。

②劇症型心筋炎への IVIg 治療評価：致死性の劇症型心筋炎の疾患モデルであるラット実験的自己免疫性心筋炎モデル (EAM) は、T 細胞依存性心筋炎であり、EAM を作成し、治療

群の第 1 日目に pCAGGS-IL-10-Ig をハイドロダイナミクス法を用いて遺伝子導入し、その治療効果を検討した。また、IL-17 関連遺伝子発現の時間経過、標的細胞を定量的 RT-PCR にて検索した。さらに IL-10-Ig を EAM の脾臓からえられた培養細胞に加え、IL-17 を含むいくつかの免疫関連蛋白に対する影響を検討した。

#### 3) ヒト型人工免疫グロブリンの安定性・安全性の評価

①安定性：宿主株の遺伝子安定性、発現ベクターにおける有害遺伝子配列の否定、組み換えグロブリン製剤の安定性を検討した。

②毒性試験：組み換えグロブリン製剤の毒性：急性、亜急性、生殖発生毒性試験、抗原性、変異原性、局所刺激性、発熱性、不純物の毒性、加速試験を検討した。

## 2. 臨床分科会

### 1) IVIg の治療評価

MPO-ANCA 陽性急速進行性糸球体腎炎 (RPGN)、急性期川崎病、難治性血管炎、SLE などの疾患に対する IVIg 療法を検討し、治療効果を検討した。(臨床報告は、各分担者報告書の「方法」を参照)

2) Bio-Plex 法による治療評価：IVIg 療法による治療効果するあらたな方法として Bio-Plex<sup>TM</sup> によるサイトカイン・ケモカイン測定法を導入した。特に、27plex Array (IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17, TNF- $\alpha$ , Eotaxin, FGFbasic, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1b, PDGF-bb, RANTES, VEGF) を用いて血漿中のサイトカイン・ケモカインを測定した。

#### (倫理面での配慮)

患者の血液・血清の使用に当たっては、主任研究者の該当部分については、国立感染症研究所の倫理委員会 (以下「委員会」) 規定に従い実施した。具体的には、患者の検体が派生することが予想される場合には、1) 研究計画を含む具体的な研究計画書、2) 主治医を含む共同研究者との合意文書、患者とのインフォームドコンセントに関する実施計画概要を記載した書式を予め「委員会」に提出し、「委員会」の許可を得て実施することとし、個人情報 はコード化し、ネットワークでの個人

情報交換はしないなど、ブラーベート情報の漏洩がないよう万事を期した。また、分担研究者において実施する場合も同様の手順により行い、所属機関の倫理規定により許可を得て実施した。さらに、動物実験に関しては、動物実験計画書を所属機関の動物委員会（分担研究者においては当該機関の同等委員会）の許可を得て、動物愛護のもとに行った。

## C. 研究結果

本年度の事業計画を綿密に討議し、主な結果を記載した。尚、詳細な「結果」については、各分担研究者報告の「結果」の項を参照。

### 1) ヒト型人工化免疫グロブリンの作製と発現ベクターライブラリーの検定

昨年度、Sy-huPFvのプライマリーバッチの解析から有効クローンについての多様性の保持が確認できたことから、より製剤化に向けた改良型、すなわち精製のための人工ペプチドであるヒスチジンタグを除いた人工ポリクローナルガンマグロブリンライブラリーの作成を行い、その性状と多様性について検討した。この改良型を作成するに当たり構成方法を変更しVLクローンを作成した後VHを導入した。作成されたライブラリーより解析が可能であった768個のクローンの塩基配列解析から、フレームが完全であったものは151クローン(19.7%)となり、昨年度のプライマリーバッチより若干低下した。抗体反応の鍵となるVHフラグメントの可変部分の多様性と重複性について検討したところ、同一種と思われるクローンが151個中36回検出され、有効なクローンの種類数としては115種類が含まれており、全クローンからの割合では15%という成績であった。一方で、有効なクローンのホモロジー解析からTNF $\alpha$ やシグナル因子に対するイディオタイプが多く含まれ、炎症反応の制御に役割を果たすクローンを多く含んでいることが明らかとなった。

(亀岡洋祐[医薬基盤研]、大島正道[国立感染症研]、主任研究者、分担研究者、研究協力者)

### 2) *in vitro* の検定

#### ①免疫細胞への作用：

本剤開発のためのツールとしての *in vivo*, *in vitro* 評価系の開発を検討した。*In vitro* 評価系では、ヒト末梢血リンパ球、単球、好中球を用いて、様々な評価系を構築した。

②MPO-ANCAの直接的作用による糸球体血管内皮細胞の活性化：糸球体血管内皮初代培養細胞のmGECに、Anti-rmMPO抗体を加えたことで、接着分子(ICAM-1, VCAM, E-selectin)の発現は、濃度依存的に増加し、このときKCなどの幾つかのケモカインやTNF- $\alpha$ の発現量も同時に増加する傾向が見られた。

(長尾朋和[千葉大学大学院・医学研究院]、主任研究者、山本健二[国立国際医療センター]、河内正治[国立国際医療センター]、荒谷康昭[横浜市立大学]、主任研究者、研究協力者)

### ③MPO-ANCA腎炎患者におけるサイトカイン・ケモカイン産生

高サイトカイン・ケモカイン血症が病状と関連していると考えられるMPO-ANCA腎炎の病因解明には、少量の血液で多項目のサイトカイン・ケモカインが短時間で測定可能であるBio-Plex法が有用であると考えられ、27plex Array (IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17, TNF- $\alpha$ , Eotaxin, FGFbasic, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1b, PDGF-bb, RANTES, VEGF)を用いて血漿中のサイトカイン・ケモカインを測定した。その結果、治療前のMPO-ANCA腎炎患者では、IL-2, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IP-10, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1b, PDGF-bb, VEGFが健常人の値に比較して有意に上昇しており、多様なサイトカインがこの疾患で亢進していることが明らかとなった。更に、MPO-ANCA値とは、IL-5との間に正の相関が、IL-8, MIP-1bとの間に負の相関が認められ、CRPとIL-5には正の相関が認められた。これらの結果は、MPO-ANCA腎炎の病態にサイトカイン動態が大きく関与している可能性を示唆している。(宇野賀津子[ルイ・パストゥール医学研究センター 基礎研究部]、武曾恵理[北野病院]、主任研究者、分担研究者、協力研究者)

#### ④免疫グロブリンの血管内皮細胞への作用解析法の検討

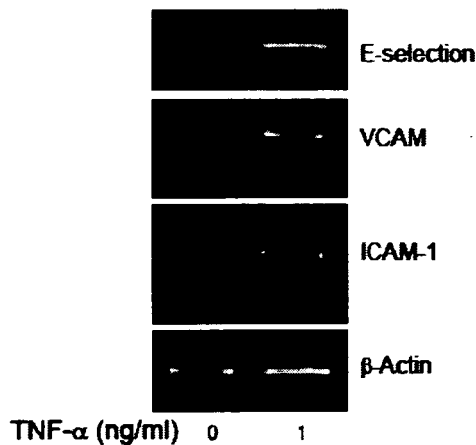


図 1 . MS-1 細胞での TNF-α 投与による E-selectin, VCAM, ICAM-1 の発現

#### 2. モデル動物によるヒト型人工免疫グロブリンの治療効果

##### 1) CAWS 誘導冠状動脈炎

CAWS によるマウス血管炎誘発モデルに対して、血管炎惹起後、長期生存させたときの動脈変化を観察した。冠状動脈には血管構築破壊を伴った高度の血管炎癒痕像が認められた。これらは川崎病動脈炎後遺病変と類似するものであり、川崎病血管炎後遺病変モデルとしても適用可能と考えられた。

(高橋啓[東邦大学医療センター大橋病院病理]、主任者研究者、基礎班[分担者、協力者全員])

##### 2) 劇症型心筋炎への IVIg 治療評価

致死性の劇症型心筋炎のラット実験的自己免疫性心筋炎モデル(EAM)は、T 細胞依存性心筋炎である。本モデルを用いて IVIg 療法と目的蛋白と免疫グロブリンの Fc 部分(Ig) 融合蛋白療法: IL-10-Ig の治療および IL-17 の EAM での動態、その治療と Th17 の関わりについて検討した。IL-10-Ig 治療群は、有意に心体重比、心筋炎面積率の減少および ANP の発現量の減少がみられ、IL-10-Ig は EAM に対して効果があると考えられた。一方、IL-17 は Th1 サイトカンと同様に、発症初期の T 細胞のみに発現がみられ、IL-10 の発現よりも早い時期であった。

(相澤義房[新潟大学大学院医歯薬大学院]、研究協力者)

#### 3. 臨床班

##### 1) RPGN における IVIg 治療評価

我が国の RPGN の多くを占める、MPO-ANCA 陽性症例は全身性疾患としての顕微鏡的多発血管炎 (MPA) に発症することが知られている。この疾患の病理学的パラメーターを特定し、それらの所見が、生検時の臨床的パラメーターのどの所見と相関しているかを統計学的に解析し、治療指針の一助となる可能性や IVIg 治療の効果判定の有効性を推測した。これらのパラメーターの選択においては、欧州血管炎協会 (EUVAS) で採択され、また臨床パラメーターとの相関を認められているものとの相同性を念頭におき選択した。さらに本疾患で有意に上昇している各種炎症制裁とサイトカインを BioPlex 法で多数を同時に検索し、これらと病理パラメーターとの相関性を検索して、その病変傷害性への関与を特定した。

(武曾恵理[北野病院]、臨床班分科会員および協力研究者)

##### 2) 川崎病の IVIg 治療評価

小児期の代表的な血管炎症候群である急性期川崎病の治療の第一選択は IVIg の超大量単回療法である。2003 年より IVIg 超大量単回投与が承認され、現在では 83% の症例に使用され、90% 以上は 1 ないし 2g/kg (24~48 時間) の超大量単回投与である。しかし、一部には副作用が報告され、また 15% 程度には IVIg 不応があるため、今回市販後使用調査を各製薬企業のご協力を得て検討した。その結果、副作用は 484 例 (6.7%) 697 件、重篤な副作用は 76 例 (1.05%)、85 件 (死亡: 0 例) に認められた。

(佐地 勉[東邦大学医療センター大森病院小児科]、研究協力者)

##### 3) 難治性疾患への IVIg 療法の検討

皮膚型 PN に対して人工ガンマグロブリン大量治療を考えた。まず、皮膚型 PN の病態を検討した。皮膚型 PN は、MPA, WG, CSS 症例と比べ、女性が多く (男女比 2:7)、年齢が若い傾向 (中央値 45 歳) にあった。発症から長期間 (中央値 7.5 年) 観察しても全身型 PN や他の疾患に移行しないことが理解された。皮膚に限局する限局型 PN の 1 型であることが考えられた。皮膚型 PN では難治性下腿潰瘍・足壊疽が起こる。切断手術を回避する目的にて、人工ガンマグロブリン大量治療が必

要・有用であると考えられた。

(小林茂人[順天堂大学医学部付属越谷病院]、研究協力者)

#### 4) 腎炎の免疫グロブリンの免疫グロブリン大量療法

ANCA 関連腎炎に対する免疫グロブリン大量療法の効果と安全性の検討を臨床的に行った。ANCA 関連腎炎による急速進行性糸球体腎炎を呈している患者2名に対してIVIg療法を施行し、その治療効果について検討し、感染予防・治療効果の点において、いずれも良好な治療成績を得た。

(今井圓裕[大阪大学医学系研究科老年・腎臓内科]、研究協力者)

#### 5) MPO-ANCA 関連腎炎の早期の診断

RPGN の経過をとり多彩な病態を持つMPO-ANCA 関連腎炎は、早期の診断が重要であるが、そのためにBVASを普及させる。末期腎不全に至る腎障害の腎病変の特徴を明らかにし、血清クレアチニンとの関連も解析する。IVIg療法など、いかなる治療を試みても、組織学的にすでに可逆性の病変であれば、治療に不応性であることを明らかにしたい。このことにより、腎機能が改善するポイントを明らかにすることは、適切な治療の介入時期を腎生検施行出来ない症例でも予測することが出来る。

(湯村和子[自治医科大学腎臓内科]、研究協力者)

#### 6) SLE、ループス腎炎へのIVIg有効例

全身性エリテマトーデス(SLE)では、様々な自己抗体を伴うことが知られている。SLEの加療中にCNSループスによるけいれん発作を併発し、血清にPR3-ANCA高度陽性を認め、IVIg療法が奏功した一例を経験した。症例は24歳女性。1年前より顔面紅斑、口腔内潰瘍、脱毛傾向を自覚するようになり、その後両下肢の浮腫が出現、近医受診し、SLE、ループス腎炎(WHO IV-G(A); 半月体形成性糸球体腎炎)と診断された。2ヵ月にわたるプレドニン(PSL)60mg/dayの治療に加え、エンドキサンプルス療法、ステロイドパルス療法を施行されたが、ネフローゼ、貧血、炎症所見の改善が認められず、腎機能障害が進行したため当院転院となった。転院後1ヵ月間はPSL 60mg/dayを継続し、CMV陽性、呼吸器感染症合併のためγグロブリン製剤(5g 6日間)の投与など感染症に対して加療を行った。腎機能障害は次第に改善し、

補体も正常化した。CNSループスを疑わせる痙攣発作を発症し、貧血の進行、CRP高値を認め、PR3-ANCA 142 EU/lと高値を確認したため、病状にANCAの関与を否定できず、IVIg(20g 5日間)を施行した。その後、貧血、炎症所見は改善し、PR3-ANCAも40-50 EU/lまで低下し、PSLの減量後退院となった。大量のステロイド薬、免疫抑制薬の使用にもかかわらず、治療抵抗性であったPR3-ANCA陽性の全身性エリテマトーデスの1例に対して、IVIgを施行し良好な結果を得た。

(山縣邦弘[筑波大学院医学研究科]、研究協力者)

#### 6) ANCA 関連腎血管炎の国内疫学調査

宮崎県下でのANCA 関連腎血管炎の2005～2007年の3年間の疫学調査を行い、先の5年間(2000～2004年)の後方視的調査結果と比較検討した。この3年間のANCA-PRVの発生頻度は先の5年間と同等であったが{19.6(CI.17.1-22.2) vs. 14.8(CI. 10.8-18.9) /100万人・年}、今回の調査では以前には確認されなかったWegener肉芽腫、Churg-Strauss症候群に伴うANCA-PRVを各々2例、3例認めた。また、PR3-ANCA陽性の3症例も今回は確認された。しかし、今回の検討においても宮崎地区におけるPRVのほとんどはMPA/RLVであり、しかも多くはMPO-ANCA陽性であることが再確認された。

(布井博幸[宮崎大学医学部小児科]、研究協力者)

#### 4. モデルマウスの誘導に関する基礎的検討および評価法の開発

##### 1) *Candida albicans* 由来可溶性菌体外多糖CAWSに関する研究

*Candida albicans* 菌体周辺環境変化は、細胞壁多糖、特にmannanの構造変化を誘起することを明らかにした。また、完全合成培地で培養した*Candida*の細胞壁抽出物は、CAWSと同様にマウスに対して急性のアナフィラキシー様ショックおよび血管炎を惹起した。興味深いことに、YPD培地、27℃で培養した菌体から得られた細胞壁抽出物のみが、これらの生理活性を有していなかった。YPD培地、27℃の細胞壁抽出物には他の細胞壁抽出物にはないβ-mannanが特異的に発現されていたことから、β-mannanが血管炎やアナフィラキシー様ショック誘発に対して負に作用していることが考えられる。



(大野尚仁[東京薬科大学薬学部]、分担研究者および協力研究者)

## 2) 多段差引法および DNA マイクロアレイ解析

IVIg は特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) などの自己免疫疾患に対する有効な治療のひとつであるが、その仕組みは不明である。本研究では、その理解の手段として、幾つかの自己免疫疾患患者由来の血液細胞で特異的に転写誘導 (抑制) されている遺伝子群を包括的に同定して、その疾患との関連を調べてきた。対象とした自己免疫疾患は ITP などとの比較のために慢性関節リウマチ(RA)、全身性エリテマトーデス(SLE)、顕微鏡的多発血管炎(MPA)、高安動脈炎(TA)、ウエグナー肉芽腫症 (WG)、チャグ・シュトラウス症候群 (CSS)などである。本年度は、各疾患特異的な遺伝子発現診断マーカーの探索を進めた。そのため、まず健常人血液細胞 (PBMC: peripheral blood mononuclear cells) 特異的に転写誘導される遺伝子群 (PREP) を包括的に単離し、DNA マイクロアレイ解析により、CSS 患者について詳細に調べ、いくつかの CSS 特異的に転写誘導 (抑制) される PREP 遺伝子を同定する事ができた。

(野島 博[大阪大学微生物病研究所])

## 3) 好中球産生分子の役割の解析

### ①食細胞NADPH-オキシダーゼ

食細胞NADPH-オキシダーゼのノックアウトマウス(CGDマウス)の肺にザイモザンを投与すると、CGDマウスは野生型マウスよりも重篤な肺炎を誘発した。肺に浸潤した細胞のほとんどは好中球であった。すなわち、好中球や単球からのスーパーオキシド産生が欠如すると、菌体成分で誘発される好中球性の肺炎を誘発しやすくなることが明らかになった。

(荒谷康昭[横浜市立大学大学院国際総合科学研究科])

### ②好中球接着因子 Mac-1 の血管炎における機能の解析

好中球依存性血栓性糸球体腎炎モデルを新規に構築し、好中球機能制御に重要な接着因子 Mac-1 とエラスターゼの機能を解析した。

(平橋淳一 [東京大学医学部府付属病院腎臓内分泌内科])

## 5. 安全試験

現在施工中の動物実験に使用している人工

免疫グロブリンの安全性について、感染性因子、内因性・外因性毒素、炎症惹起分子の特定など、感染研の安全研究ガイドラインを基に安全性を検討し、臨床に向けた原案を協議した。(全員)

## D. 考察

これまで作製してきたマウス型人工グロブリンは、血管炎モデルマウスに有効であり、治療法として予備的に完成した IVIg 治療の血管炎への有効性の予備成績を基に、ヒト型の作製してきている。小児に多発する血管炎である川崎病や、MPO-ANCA 関連血管炎の発症頻度は日本で欧米より高く、日本での血管炎に適した IVIg 治療による補助療法が求められていた。これまでの川崎病の治療法を適用してきた日本での治療実績が、血管炎の有効な治療法として確立できる段階まできた。また、血管患者は高齢者であるので、IVIg 治療により、ステロイド投与量を少なくしてその危険性の軽減することができるようになった。そして、免疫グロブリンの需要増加やリスク軽減から免疫グロブリンの人工化を推進し、ヒト型人工免疫グロブリンのプロトタイプが作製できたことは、将来の臨床へ向けて前進した。

## 基礎班：ヒト型人工免疫グロブリン作製と評価法

### 1) ヒト型人工免疫グロブリン作製とその品質

昨年度の Sy-huPFv のプライマリーバッチの解析から有効クローについての多様性の保持が確認できたことから、より製剤化に向けた改良型、すなわち精製のための人工ペプチドであるヒスチジンタグを除いた人工ポリクローナルガンマグロブリンライブラリーの作成を行い、その性状と多様性について検討できた。抗体反応の鍵となる VH フラグメントの可変部分の多様性と重複性と有効なクローンのホモロジー解析から TNF $\alpha$  やシグナル因子に対するイディオタイプが多く含まれ、炎症反応の制御に役割を果たすクローンを多く含んでいることが明らかとなった。製剤化への問題点として有効クローン率をさらに改善する必要性が示唆された。

### 2) *in vitro* 評価系の開発

本剤開発のためのツールとしての *in vivo*, *in vitro* 評価系の開発を検討し、ヒト末梢血リ

ンパ球、単球、好中球を用いて、様々な評価系を構築できたので、今後は、*in vivo* との相関をマウスモデルやヒトの細胞系で検討する必要がある。また、血管内皮細胞を使った評価系を開発できる見通しができたことは *in vitro* での解析が、*in vivo* での有効性と相関を評価する上で重要である。また、作用機序を解明する上でも有用である。一方、血管炎のリスク分子である MPO 抗体が直接血管内皮細胞と反応し、接着分子の発現を誘導して好中球等の白血球が接着・遊走しやすい環境を作っていることが示された。加えて、この接着分子の発現は、MPO 抗体が糸球体血管内皮細胞表面の何らかの分子に結合してシグナルを伝達していることが原因と考えられる。また、免疫グロブリンの血管内皮細胞を接着分子の発現を解析する条件検討が進み、これに関連して炎症分子などの解析も進んだ。

### 3) モデル動物での評価系の開発

CAWS によるマウス血管炎誘発モデルでは川崎病動脈炎後遺病変と類似するものであり、川崎病血管炎後遺病変モデルとしても適用可能であると考えられる。また、劇症型心筋炎疾患モデル EAM を用いて IVIg 療法と目的蛋白と免疫グロブリンの Fc 部分(Ig) 融合蛋白療法により、IL-10-Ig の治療および IL-17 の動態解析し、IL-10-Ig は TNF- $\alpha$  や IL-1 だけでなく IL-17 の発現を抑制があり、治療効果の機序の一つと考えられた。本モデルも治療効果判定に利用可能と考えられる。

## 2. 臨床班：IVIg 治療の評価

### 1) RPGN、血管炎

我が国の RPGN の多くを占める MPO-ANCA 陽性症例は全身性疾患としての MPA に発症する。この疾患の病理学的パラメーターを特定し、それらの所見が、生検時の臨床的パラメーターのどの所見と相関しているかを統計学的に解析し、治療指針の一助となる可能性や IVIg 治療の効果判定の有効性を推測できた。これらのパラメーターの選択には、欧州血管炎協会 (EUVAS) で採択され、また臨床パラメーターとの相関を認められているものとの相同性を念頭におき選択したことは本班を中心とした日欧合同会議の情報交換の関与が大きい。また、難治性血管炎皮膚型 PN の病態では難治性下腿潰瘍・足壊疽が起こる。切断手術を回避する目的にて、免疫グロブリ

ン大量治療が必要・有用であると考えられた。

### 2) 川崎病の IVIg 治療評価

小児期の代表的な血管炎症候群の急性期川崎病の治療の第一選択は IVIg の超大量単回療法超大量単回投与であるが、一部には副作用や IVIg 不応があり今回の調査で、副作用は 484 例 (6.7%) 697 件、重篤な副作用は 76 例 (1.05%)、85 件 (死亡: 0 例) の結果は、HIV、感染、ギランバレー症候群、CIDP、血小板減少性紫斑病 (ITP) などにおける使用に比べて副作用発現率は少なく、急性期川崎病には比較的安全に使用できていると思われる。

以上から、臨床応用に向けて人工免疫マクロブリンの開発、安全性について、大きな前進があった。今後も、本研究事業での臨床班および基礎班で成果を応用し、国民の保健・医療ならびに効率的な医療経済に貢献できるようにしたい。

### E. 結論

IVIg による治療法は、重症感染症や川崎病の治療や自己免疫疾患により有効な免疫補助療法として利用されたり、また、適応拡大が検討されはじめている。安全性や医療経済の点からも、人工化することが今日的急務であり、これまでに血管炎モデルマウス (川崎病、腎炎) に有効なマウス型人工免疫グロブリンを完成させ、それに基づいて、ヒト型に特化した人工型ガンマグロブリンのプロトタイプを作製することにも成功した。

本年度は、「ヒト型人工免疫グロブリン作製と評価法」として、抗体反応の鍵となる VH フラグメントの可変部分の多様性と重複性と有効なクローンが確認できた。また、*in vitro* 評価系を開発した。さらに、これまでの血管炎誘発モデルに加え、劇症型心筋炎モデルも治療効果判定に利用可能と考えられるモデル動物での評価系が追加できた。そして、「RPGN、血管炎、川崎病」での IVIg 治療の評価が進展した。

以上から、臨床応用に向けて人工免疫マクロブリンの開発、安全性について、大きな前進があり、社会的にも注目されはじめている (日経 2 月 1 1 日付け)。今後も、本研究事業での臨床班および基礎班で成果を応用し、国民の保健・医療ならびに効率的な医療経済に

応えるようにしたい。

尚、本プロジェクトは、主任研究者、分担者研究に加え、以下の協力研究者、アドバイザーの協力を得た。

#### 協力研究者、アドバイザー

##### 1) 臨床班協力研究者

小野孝彦 (静岡県立大・薬・教授)  
深津敦司 (京大・附属病院・腎臓内科・講師)  
山崎 力 (東京大・院医・教授)  
有村義宏 (杏林大・医・助教授)  
胡麻田学 (長門総合病院・部長)  
山西裕司 (広島市民病院・部長)  
赤松 明 (愛媛県立新居浜病院・副院長)  
猪原登志子 (北野病院医学研究所・研究員)

##### 2) 臨床班国際協力部門協力者

稲葉 裕 (順天堂大・医学部・教授)  
高崎芳成 (順天堂大・医学部・教授)  
佐々木毅 (東北大・名誉教授)  
堀田 修 (仙台社会保険病院・センター長)  
井関邦敏 (琉球大・医学部附属病院・准教授)  
原淵保明 (旭川医科大・教授)  
城 謙輔 (千葉東病院・部長)  
杉山隆夫 (下志津病院・病棟部長)  
松本俊治 (順天堂大医・准教授)

##### 3) 基礎班協力研究者

新井孝夫 (東京理科大学・教授)  
佐々木次雄 (国立感染症研・血液安全性・室長)  
古谷昌弘 (積水化学・水無瀬研・主任研究員)  
鈴木章一 (オタゴ大学医・post-doctor)

##### 4) アドバイザー

仁保喜之 (千早病院長)  
橋本博史 (順天堂大学名誉教授)  
直江史郎 (東邦大学医学部名誉教授)  
岡崎富男 (広島市立市民病院長)  
中山俊憲 (千葉大大学院医学研究院教授)  
David Jayne (英国ケンブリッジ大顧問)

#### 参考資料 (別紙)

臨床応用に向けて人工免疫グロブリン開発、安全性において大きな前進があった (日経 2月11日)、(公開成果発表会—第二回班会議)。また、わが国とヨーロッパでのIVIg治療の安全性の確保や日英での血管炎の相違の検討：日英一血管炎の疫学調査研究の会議および班会議を2回開催した (第一回班会議、国際会議)。

#### F. 健康危険情報

今年度は、特になし。

#### G. 研究発表：主任研究者分のみ (分担者については分担者の項を参照)

##### 1. 論文発表

1. Kiwamu Nakamura, K. Suzuki et al. Deoxynucleic acids from *Cryptococcus neoformans* activate myeloid dendritic cells via a TLR9-dependent pathway. J. Immunol., in press, 2008.
2. K. Suzuki, Shigeto Kobayashi, Kazushige Yamazaki, Masaaki Gondo, Kazuo Tomizawa, Yoshihiro Arimura, Kimimasa Nakabayashi, Shoichi Ozaki, Masaharu Yoshida, Toshiharu Yoshida, Norimasa Tsusaka, Eri Muso, Tomio Okazaki, and Hiroshi Hashimoto. Analysis of risk epitopes of anti-neutrophil antibody MPO-ANCA in vasculitis in Japan population. Microbiol.Immunol.51: 1215-1220, 2007.
3. Shigehiro Uezono, Yuji Sato, Seiichiro Hara, Shuichi Hisanaga, Keiichi Fukudome, Shouichi Fujimoto, Hiroyuki Nakao, Kazuo Kitamura, Shigeto Kobayashi, Kazuo Suzuki, Hiroshi Hashimoto, Hiroyuki Nunoi. Outcome of ANCA-associated primary renal vasculitis in Miyazaki Prefecture. Internal Medicine, 46: 815-822, 2007.
4. Melissa Goedken, Sally McComick, Kevin G. Leidal, Kazuo Suzuki, Yosuke Kameoka, Joshua M. Astern, Meilan Huang, Artem Cherkasov, William M. Nauseef. Impact of two novel mutations on the structure and function of human myeloperoxidase. J. Biol. Chem. 282:27994-8003, 2007.
5. Akiyoshi Hoshino, Tomokazu Nagao, Toshiko Ito-Ihara, Akiko Ishida-Okawara, Kazuko Uno, Eri Muso, Noriko Nagi-Miura, Naohito Ohno, Kazuhiro Tokunaka, Shiro Naoe, Hiroshi Hashimoto, Masato Yasuhara, Kenji Yamamoto, Kazuo Suzuki. Trafficking of QD-conjugated MPO-ANCA in Murine Systemic Vasculitis and Glomerulonephritis model mice. Microbiol.Immunol.51: 551-566, 2007.
6. Akiko Ishida-Okawara, Noriko Nagi-Miura, Toshiaki Oharaseki, Kei Takahashi, Akinori Okumura, Hitoshi Tachikawa, Shin-ichiro Kashiwamura, Haruki Okamura, Naohito Ohno, Hidechika Okada, Peter. A. Ward, Kazuo Suzuki. Neutrophil activation and induced by *C. albicans* water-soluble mannoprotein- $\beta$ -glucan complex (CAWS). Exp. Mol. Pathol. 82: 220-226, 2007.
7. Tomokazu Nagao, Mimiko Matsumura, Ayako Mabuchi, Akiko Ishida-Okawara, Osamu Koshio, Haruyuki Minamitani, and Kazuo Suzuki. Up-regulation of adhesion molecule expression in glomerular endothelial cells by anti-myeloperoxidase antibody. Neprol. Dialysis Transplant. 22: 77-87, 2007.
8. 鈴木和男 血管炎の病態と好中球 臨床検

査 51 卷 1071-1080, 2007

9. 鈴木和男 「好中球の機能調節」 生体防御医学辞典(鈴木和男 監修、朝倉書店)164-169, 2007
10. 大川原明子、長尾朋和、鈴木和男 血管炎の発症にかかわる分子と好中球」 生体防御医学辞典(鈴木和男 監修、朝倉書店) 309-312, 2007

## 2. 学会発表 国際会議

1. Tomokazu Nagao, Mimiko Matsumura, Ayako Mabuchi, Akiko Ishida-Okawara, Haruyuki Minamitani, Toshinori Nakayama, and Kazuo Suzuki. Direct Activation of Glomerular Endothelial Cells by Anti-MPO Antibody, 13ANCA-Workshop, April 26-29, 2007, Cancun, Mexico
2. Toshiko Ito-Ihara, Kazuo Suzuki, Kazuko Uno, Toshiyuki Komiya, Tomomi Tsujii, Tatsuo Tsukamoto, Takahiko Ono, Atsushi Fukatsu, Toru Kita, Eri Muso. Circulating levels of IL-12, 23 and IL-18 in patients with MPO-ANCA-associated vasculitis. 13ANCA-Workshop, April 26-29, 2007, Cancun, Mexico.
3. S Kobayashi, T Ito-Ihara, K Suzuki, S Fujimoto, RA Watts, DG Scott, DJ Jayne, H Hashimoto and the Japan-UK AAV Study Group. INCIDENCE OF ANCA-ASSOCIATED VASCULITIS IN JAPAN: A PRELIMINARY REPORT FROM JAPAN-UK COLLABORATION STUDY. 13ANCA-Workshop, April 26-29, 2007, Cancun, Mexico.
4. E. Muso, K. Uno, T. Ito-Ihara, T. Komiya, K. Suzuki. Immunomodulatory effect of intravenous immunoglobulin (IVIg) therapy in MPO-ANCA related polyangiitis with RPGN by amelioration of impaired IFN $\alpha$  production (IFN-P) . 13ANCA-Workshop, April 26-29, 2007, Cancun, Mexico.
5. R A Watts, D G Scott, D J Jayne, S Kobayashi, K Suzuki, H Hashimoto and S Fujimoto EPIDEMIOLOGY OF RENAL ANCA-ASSOCIATED VASCULITIS IN THE UK AND JAPAN. 13ANCA-Workshop, April 26-29, 2007, Cancun, Mexico.
6. W. Yumura, J. Yamashita, M. Itabashi, T. Nagao, A. Ishida-Okawara, T. Matsuo, A Hasegawa, Y. Aratani, K. Nitta, T. Nakayama and K. Suzuki. Contribution of CD69 in MPO-ANCA-associated glomerulonephritis in mice. 13ANCA-Workshop, April 26-29, 2007, Cancun, Mexico.
7. Kazuko Uno, Eri Muso, Toshiko Ihara, Toshiyuki Komiya, Yoshiki Omatsu, Yoko Mitsuishi, Kayo Inaba, Kazuo Suzuki. Comparison of IFN-alpha production in response to Sendai virus stimulation and the number of peripheral plasmacytoid dendritic cells in healthy subjects and patients with various diseases: Characteristics of MPO-ANCA-associated glomerulonephritis and vasculitis. 13ANCA-Workshop, April 26-29, 2007, Cancun, Mexico.
8. K. Suzuki. Molecular Events on Damage of Glomerular Endothelial Cells bound with MPO-ANCA, International Symposium on Primary Systemic Vasculitis, September 29, 2007, Tokyo
9. Kazuo Suzuki. Trace of Myeloperoxidase (MPO) in Vasculitis Development. The 2nd Asian Meeting on Synchrotron Radiation Biomedical Imaging. November 23-25, 2007, Jeju, Korea
10. Kazuo Suzuki. Current Situation of Synthetic Immunoglobulins and Their Therapeutic Approach. International Conference on Regulation of Inflammatory Diseases Vasculitis and Asthma - 2008 in Chiba - Therapeutic Strategy for Vasculitis Based on International Collaboration Researches. January 18-19, 2008, Chiba, Japan.
11. Kensuke Joh, Takashi Nakazato, Takao Sugiyama, Eri Muso, Wako Yumura, Shigeto Kobayashi, Kazuo Suzuki. Morphological variety of MPO-ANCA related renal small vessel vasculitis in Japan : Correlation between histological and clinical parameters. International Conference on Regulation of Inflammatory Diseases Vasculitis and Asthma - 2008 in Chiba - Therapeutic Strategy for Vasculitis Based on International Collaboration Researches. January 18-19, 2008, Chiba, Japan
12. Yosuke Kameoka, Masahiro Furutani, Kazuo Suzuki. Prevalence of variety of artificial poly-clonal gamma globulin. International Conference on Regulation of Inflammatory Diseases Vasculitis and Asthma - 2008 in Chiba - Therapeutic Strategy for Vasculitis Based on International Collaboration Researches. January 18-19, 2008, Chiba, Japan.
13. Shigeto Kobayashi, Shoichi Fujimoto, Kazuo Suzuki. Update Japan/EUVAS projects. March 3-4th 2008, Zurich.

## 国内会議

1. 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「MPO リーダーペプチドは好中球顆粒に局在する」炎症制御フォーラム千葉、2007年7月13-14日、千葉
2. 武曾恵理、宇野賀津子、猪原登志子、古宮俊幸、鈴木和男「MPO-ANCA 陽性顕微鏡的血管炎に伴う急速進行性糸球体腎炎に対するIVIg治療の有効性のエビデンス確立と機序解明に向けて」炎症制御フォーラム千葉、2007年7月13-14日、千葉

3. 湯村和子、鈴木和男、中山俊憲「Bovine serum albumin(BSA)誘導腎炎における CD69 の関与」炎症制御フォーラム千葉、2007年7月13-14日、千葉
4. 山西裕司、小林茂人、長尾朋和、鈴木和男、岡崎富男「ウエゲナー肉芽腫症の4例」炎症制御フォーラム千葉、2007年7月13-14日、千葉
5. 長尾朋和、松村実美子、荒谷康昭、星野昭芳、山本健二、南谷晴之、鈴木和男「好中球自己抗体による糸球体内皮細胞の直接的活性化」炎症制御フォーラム千葉、2007年7月13-14日、千葉
6. 宇野賀津子、猪原登志子、藤田哲也、鈴木和男、武曾恵理「Bioplexによる血漿中サイトカイン・ケモカインの解析：その有用性と問題点」炎症制御フォーラム千葉、2007年7月13-14日、千葉
7. 小野孝彦、日浅俊介、上村和秀、雑賀寛、猪原登志子、武曾恵理、大川原明子、鈴木和男「ANCA関連腎炎モデル SCG/Kj マウスにおける肺の組織像および血管病変の腎との比較検討」炎症制御フォーラム千葉、2007年7月13-14日、千葉
8. 宇野賀津子、武曾恵理、尾松芳樹、八木克己、猪原登志子、三石瑤子、村上善基、小宮俊幸、鈴木和男「IFN- $\alpha$ 産生能とプラズマサイトイド樹状細胞数：健常人と癌、HCV肝炎、MPO-ANCA腎炎の比較」第7回高加齢学会、2007年7月20-21日、京都
9. 宇野賀津子、武曾恵理、尾松芳樹、八木克己、猪原登志子、三石瑤子、村上善基、小宮俊幸、谷川真理、鈴木和男、藤田哲也「健常人と各種疾患患者の末梢血のセンダイウイルス刺激 IFN- $\alpha$ 産生能とプラズマサイトイド樹状細胞数との相関」第72回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、2007年10月24日、京都
10. 富澤一夫、雑賀寛、大島正道、長尾朋和、楠玲奈、新井孝夫、小林和夫、中山俊憲、田之倉優、鈴木和男「急速進行性糸球体腎炎の15-Deoxyspergualin治療による自己抗体 MPO-ANCA 値とそのリスクエピトープの減少」第18回日本生体防御学会総会：7月26-28日、九大医学部百年講堂、福岡市
11. 鈴木和男「難治性血管炎 MPO-ANCA の発症機序の解析と免疫グロブリン治療法」千葉がんセンター講演会、2007年10月24日、千葉
12. 西尾壽乗、鬼丸満穂、三浦典子、大野尚仁、高橋啓、鈴木和男、原寿郎、居石克夫「抗 VEGF-A 抗体、抗 TNF $\alpha$  抗体投与によるマウス CAWS 惹起冠動脈炎の発症抑制効果に関する病理学的検討」、第48回日本脈管学会、2007年10月25-27日、松本
13. 宇野賀津子、武曾恵理、猪原登志子、八木克己、藤田哲也、鈴木和男「MPO-ANCA腎炎のサイトカイン・ケモカイン動態：Bio-Plex法による網羅的解析」第13回 MPO 研究会、10月26-27日、広島
14. 富澤一夫、長尾朋和、雑賀寛、大島正道、小林和夫、中山俊憲、鈴木和男「急速進行性糸球体腎炎自然発症 SCG/Kj mouse への15-Deoxyspergualinの投与はMPO-ANCAとそのrisk epitopeの減少を引き起こす」第13回 MPO 研究会、10月26-27日、広島
15. 河内正治、鈴木和男「ARDS患者における急性期 BALF 中 Cytokines 値測定」第13回 MPO 研究会、10月26-27日、広島
16. 常賀、鈴木和男、埴晴雄、小玉誠、相澤義房「劇症型心筋炎に対する IL-22-Ig 融合蛋白治療の検討」第13回 MPO 研究会、10月26-27日、広島
17. HOSHINO Akiyoshi, NAGAO Tomokazu, MIURA Noriko, OHNO Naohito, NAKAYAMA Toshinori, SUZUKI Kazuo「MPO-ANCA induces IL-17 production by activated neutrophils of murine systemic vasculitis」第37回免疫学会、2007年11月20-22日、東京・品川
18. Kazuo Tomizawa, Tomokazu Nagao, Kan Saiga, Masamichi Oshima, Kazuo Kobayashi, Toshinori Nakayama, and Kazuo Suzuki「Decrease of MPO-ANCA involving risk epitopes by treatment with 15-Deoxyspergualin in spontaneous MPO-ANCA-related vasculitis model SCG/Kj mouse」第37回免疫学会、2007年11月20-22日、東京・品川
19. 仲村 究、宮里明子、肖 剛、八田益充、青柳哲史、位田 剣、西城 忍、岩倉洋一郎、竹田 潔、審良静男、鈴木和男、賀来満夫、川上和義「Cryptococcus neoformans 由来 DNA によるマウス骨髄由来樹状細胞の活性化機序の解析」第37回免疫学会、2007年11月20-22日、東京・品川
20. 宮里明子、仲村 究、Xiao Gang、鈴木和男、賀来満夫、川上和義「真菌由来 DNA による樹状細胞活性化における細胞内動態の解析：CpG-ODN との比較検討」第37回免疫学会、2007年11月20-22日、東京・品川

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

### 付属資料-1

日経新聞記事（日経2月11日）

### 付属資料-2

第1回班会議プログラム

### 付属資料-3

公開成果発表会-第2回班会議プログラム

### 付属資料-4

国際会議プログラム

## 人工免疫グロブリン合成に関する研究

### ポリクローナル人工ガンマグロブリンを構成するクローンの多様性の検討

分担研究者 亀岡洋祐（独）医薬基盤研究所・生物資源研究部 主任研究員

分担研究者 大島正道 国立感染症研究所・免疫部 室長

研究要旨：本分担研究においては、昨年度の人工ポリクローナルガンマグロブリンプライマリーバッチの解析から有効クローンについての多様性の保持が確認できたことから、より製剤化に向けた改良型、すなわち精製のための人工ペプチドであるヒスチジンータグを除いた人工ポリクローナルガンマグロブリンライブラリーの作成を行い、その性状と多様性について検討した。この改良型を作成するに当たり構成方法を変更し VL クローンを作成した後 VH を導入した。作成されたライブラリーより解析が可能であった 768 個のクローンの塩基配列解析から、フレームが完全であったものは 151 クローン（19.7%）となり、昨年度のプライマリーバッチより若干低下した。抗体反応の鍵となる VH フラグメントの可変部分の多様性と重複性について検討したところ、同一種と思われるクローンが 151 個中 36 回検出され、有効なクローンの種類数としては 115 種類が含まれており、全クローンからの割合では 15% という成績であった。一方で、有効なクローンのホモロジー解析から TNF $\alpha$  やシグナル因子に対するイディオタイプが多く含まれ、炎症反応の制御に役割を果たすクローンを多く含んでいることが明らかとなった。製剤化への問題点として有効クローン率をさらに改善する必要性が示唆された。

#### A. 研究目的

第 1 期及び第 2 期人工ガンマグロブリン研究班の研究により開発された人工ポリクローナルガンマグロブリンはマウス型およびヒト型人工ポリクローナルガンマグロブリンにおいて、血管炎における治療効果が確認されつつある。これまでの検討から、抗体分子内の可変領域である scFv を用いると治療効果があり、Fc 領域を用いても効果がみられないことから、scFv における多様性が治療効果を上げるために重要であることが推察されている。昨年度の分担研究

では poly-scFv の精製の便宜のため人工ペプチドであるヒスチジンータグを含む形でプライマリーライブラリーを構成した。積水化学の古谷らによって作成されたヒト型 poly-scFv バッチに含まれる一部のクローンについて発現プラスミドに挿入されたガンマグロブリン VL-VH 部分の塩基配列を解析することによって、抗体分子の多様性が保たれているかを検討し、ライブラリー内の有効発現クローンの比率は 28% であり、有効クローン 107 個の中には重複は観察されなかった。このプライマリーライブラリ

一構築の再には scFv タンパク精製の便宜のためヒスチジン 6 残基からなる人工のタグペプチドを含んで構成されていた。製剤化のためにはできる限り人工産物を含まないことが条件の一つであり、ヒスチジntagを含まないライブラリーの構築が必要である。今年度はヒスチジntagを含まない形で構成したセカンダリーライブラリーの多様性の保持と重複の程度、また含まれているイデオタイプの検討を行った。

ヒト抗体の生体内での多様性はイデオタイプとして 10 の 10 乗個から 12 乗個が含まれている事が推察されており、マウスにおけるイデオタイプで 10 の 8 乗個から 10 乗個と推定されている。これら全てのイデオタイプが生体内で機能しているとは考え難く、このうちの一部のみが有効に機能しているものと考えられる。

使用している RNA のリソースは健康成人末梢血から得ているので、ある程度成熟度の高い B 細胞クローンの集合であり、H 鎖、L 鎖ともに再構成が終了した後のクローンと考えられる。したがって、体内で有効な抗体を産生するイデオタイプクローンの集合とも考えられる。本分担研究ではポリクローナルガンマグロブリンのイデオタイプクローン整列化を進めることによって、炎症制御、感染制御、生体反応制御に有効な効果を示すサブポリクローナルな人工抗体の集合を性状既知のイデオタイプを多数組み合わせることによって構成することも将来的な目標として考えていることから、昨年度とあわせて、整列化したイデオタイプライブラリーに集積し昨年度の 107 とあわせて 222 個の性状の確定したイデオタイプクローンとして整列収容することも目的としている。

古谷らによって作成されたヒト型

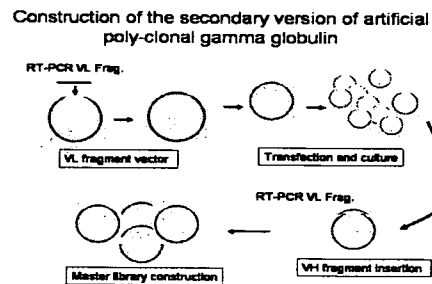
poly-scFv のバルクは 10 の 8 乗個程度のクローンを含んでおり、この中でも有効に機能するイデオタイプはその一部と考えられることから、人工抗体クローンバッチに含まれる個々のクローンの整列化を視野に入れつつ、パイロットバッチの解析を行った。

## B. 研究方法

### ヒスチジntagを除いた改良型ライブラリーの構築

昨年度構築したライブラリーはヒスチジntagを VL-VH フラグメントの橋渡しカセットとして含ませていたが、今年度は VL, VH を別々にクローニングする構築方法を取った。(図 1) まず VL フラグメントの RT-PCR 産物のみを pET 発現ベクターにディレクショナルにクローニングし、大腸菌にバルクでトランスフェクションした後、1 回だけ増殖させ、バルクで組換え体プラスミドを回収し、制限酵素で開裂した後、VH フラグメントの RT-PCR 産物をディレクショナルにクローニングすることによって VL-VH 複合体を形成させライブラリーとした。

(図 1 ヒスチジntagを除いた改良型ライブラリーの構築)



改良型ライブラリーに含まれるクローンの有効性、重複、イデオタイプなどの性状検討

作成したマスターライブラリーはサブライブラリーに小分けされ、その一部をプレ

ートに展開し個々のクローンを整列化し、個々のクローンの塩基配列解析を行った。

(図2) 展開したクローン 1152 個をピックアップして整列化、プラスミドを得たうえで、VL-VH のインサート部分の塩基配列を行った。1152 個のうち 768 クローンが配列解析可能であった。塩基配列は順方向、逆方向の双方から解析し確認した。

(図2 一部のクローンの整列化と解析)

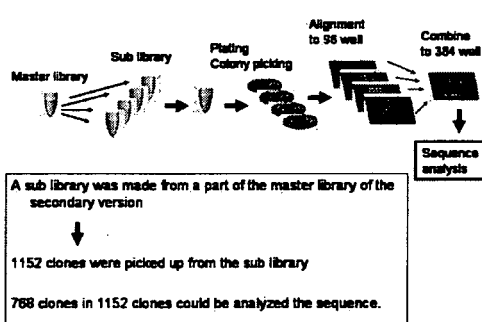
前回成績との比較

Category		前年度	前年度 (%)	今年度	今年度 (%)
Full Insert (192)	With stop codon	85	22.1	151	19.7
	No stop codon	107	27.9	151	19.7
Half Fragment		56	14.6		
Other Insert		10	2.6		
Empty plasmid		105	27.3	94	12.2
NG		21	5.5	283	36.8
No plasmid				89	11.6
合計		384		768	

### C. 研究結果

解析が可能であった 768 クローンの塩基配列解析結果を表 1 にまとめた。

(表 1)



1) 翻訳開始コドンから L 鎖—H 鎖にわたりフレームシフトもなくストップコドンも入らず VL-VH のペプチドがフルに発現できる有効クローンは 768 クローンの内 151 で 19.7% であった。238 個のクローンで配列解析のできない程度にデータ劣化がありこの数字は全体の 37% にも及ぶため今後シークエンス方法を検討する必要

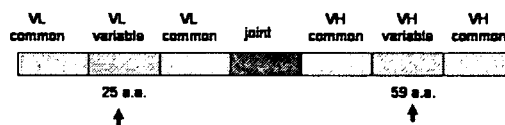
がある。

2) クローンの重複性を評価するために塩基配列を 7 つのフラグメントに分けてデータベースを作成した。(図 3) インサートが入っていない空のプラスミドの割合が 27% と比較的高率であった。

(図-3)

Data base construction

- The base sequence of each clone was translated to amino acid sequence. The amino acid sequences were parted to 7 regions, such as two VL common regions, the VL variable region, the joint region (common), two VH common region and the VH variable region.
- VL and VH variable region were analyzed the homology of amino acid sequence by using the clustalw.

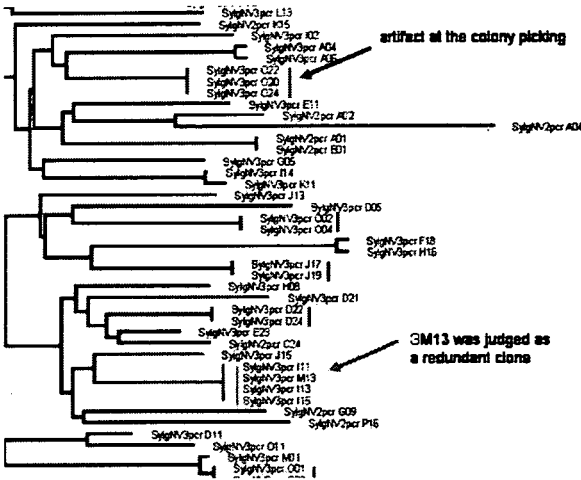


3) VH 可変領域の配列について、Neighbor-Joining 法による ClustalW を使ったホモロジー解析によりクローンの重複度の検定と含まれるクローンの関係解析を行った。図 4 にホモロジー解析結果の一部と、コロニーピックの際のアーティファクト (同一コロニーの拾い上げ) の判断例を示した。整列化した番号で連続のものは拾い上げ時のアーティファクトとして判断し、番号が連続でないものはライブラリー内に重複クローンが存在したものと判断した。scFV を産生できる 151 クローンの内、ライブラリーで重複が起きているクローンは 16 個であると判断され、拾い上げ時のミスによるものが 16 個であり、ライブラリーに含まれるイディオタイプ種類数としては、115 種類であった。(図 5) VL の可変領域についても同様のクローン間でのホモロジー解析を行ったところ、多数の重複クローンを含んでいることが判明した。(図 6) これはクローニング時に VL を先行してクローニングし増幅しているためであると考え



られ、更なる方法の改良が必要である。

(図 4 ClustalW を用いたホモロジー解析の一部と重複クローンの判断)



(図 5)

Estimation of unique clones in 151 complete

Redundant clones at picking artifact	2 clones	12 times
	3 clones	4 times
Redundant in the sub library	2 clones	16 times

Minus from 151 complete  
**Number of Unique clone**  
 151 - 12 - 2x4 - 16 = 115 (76% in 151)

(図 6 VL 可変領域によるクローン間ホモロジー)



4) ライブラリーに含まれるクローンの内容を検討するため、多様性の高い VL の可変領域を用いてデータベースサーチによるイ

デオタイプの性状検討を行った。図 7 にはアミノ酸配列で 85% 以上のホモロジーを示しかつ、相手方のアノテーションが明確であったものを 15 例列挙した。最も高頻度に見られたのは TNF $\alpha$  に対するイデオタイプで、その他の細胞シグナル因子や病原微生物に対するイデオタイプも含まれていた。図 7 最下段にデータベース上の登録イデオタイプとのホモロジーの程度を示す例を示した。VH の 59 アミノ酸残基のうち数残基によりイデオタイプ特異性を決めているものと思われる。

(図 7 タンパクデータベースサーチによる相同性の高いイデオタイプの例)

Up to 85% homology by protein data base search by using VH variable

- 2K15 TNF-alpha, streptococcal/anti-myosin, Rh(D), alpha-synuclein rabies virus, Ph1 p 11-specific, IgM rheumatoid factor RF-MR27,
  - 3I02 TNF-alpha, streptococcal/anti-myosin, glycoprotein VI, anti-rabies, Rh(D)
  - 3A04 myosin-reactive, Rh(D), glycoprotein VI, HIV-1 gp120, tetanus toxoid crotoxin, mucin1 heavy chain, anthrax monoclonal antibody F3-6
  - 3O22 TNF-alpha, alpha-synuclein intrabody, Rh(D), rabies virus
  - 3E11 TNF-alpha, streptococcal/anti-myosin,
  - 2A02 streptococcal/anti-myosin, Listeria monocytogenes,
  - 2A01 Pseudomonas aeruginosa, Rh(D), pneumococcal
  - 3G05 HEs, Rhesus D., pneumococcal/anti-dsDNA
  - 3I14 TNF-alpha, streptococcal/anti-myosin, tetanus toxoid,
  - 3K11 TNF-alpha, Rh(D), streptococcal/anti-myosin,
  - 3J13 pneumococcal, Rh(D),
  - 3O02 SARS-CoV, hepatitis B virus core antigen,
  - 3F18 EGFR, pneumococcal ab 44B7, pneumococcal ab A7,
  - 3J17 EGFR, pneumococcal ab A7
  - 3H08 pneumococcal ab 53D4, human interleukin-8, rotavirus-specific intestinal-homing antibody,
- anti TNF-alpha antibody heavy-chain Fab fragment [Homo sapiens]  
 Length=223
- Query 1 ASGFSFSTYWNVVRQAPGKGLDWFVAVVSFDGIVIHVADSVKGRFISRDNSKDTL YLQ 59  
 ASGF+FS+Y M+VVRQAPGKGL+WFVAV+S+DG +YADSVKGRF+ISRDNSK+TL YLQ  
 Subject 24 ASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWFAVISYDGSNRYVADSVKGRFTISRDNSKNTL YLQ 82

D. 考案

昨年度構成した人工ポリクローナルガンマグロブリンから製剤化のための障害となるヒスチジンタグを除いた scFv を構成方法を変更して改良型 scFv のライブラリー作成を行い、その内容および性状についての検討を行った。昨年度作成のライブラリー内容に比べ有効クローン数において

19.7%と 8%程度有効クローン数が減少し、重複率に関しても有効クローンのうち約 20%が重複していた。このことはライブラリーの構成方法について問題が生じているものと思われる。VL を一次クローニング続いて VH を二次クローニングとしたことにより重複率の増加を招いてしまったものと考えられる。人工ポリクローナル抗体としてはより多くの多様性に富んだイデオタイプを含むことが重要な条件となることから、構成方法について更なる改良が必要である。VL, VH の組み合わせに関してはランダムに組み合わせられる方法を取っているため、VL-VH 複合体を先に構成してから、発現ベクターへの組み込みを行う方法を工夫する必要がある。また VL-VH の前後関係についても N 末端—VL-VH-C 末端という前後関係は必ずしも必要ではないので、前後が入れ替わることにより、さらに多様な scFv を構成できる可能性がある。ライブラリー内には空のプラスミド及び未知挿入断片を持つプラスミドの割合がまだまだ高いのでこの点も改良を必要としている。

有効クローンのアミノ酸配列レベルでのデータベース比較解析から、ライブラリーのイデオタイプには TNF $\alpha$  などの炎症性サイトカインに対するイデオタイプや細胞シグナル因子、病原性微生物に対するイデオタイプが含まれていることが判明し、この人工ポリクローナルグロブリンが生体分子と反応できるものを含んでおり、生体機能の調節や常在する病原性微生物に対抗できる可能性を分子レベルでも確認することができた。

scFv タンパク発現精製後の問題として精製したタンパクが生体内の条件では不溶化しやすいことも研究班では問題となっていることから、配列レベルでのデータが機知となれば、親水性アミノ酸残基を多く含

むクローンを選択的に集めることによって不溶化の問題に対処することも方法のひとつとして考えられる。

昨年度の班会議において、人工ポリクローナルガンマグロブリンの内の一部のイデオタイプのクローン集団によるセミポリクローナル scFv という考え方が千葉大学中山教授から示され、1000 種類程度のイデオタイプの組み合わせによる効果的なグロブリン集団を作れる可能性が示唆され、人工ポリクローナルガンマグロブリン製剤化に有効な手段であると考えられた。このセミポリクローナルガンマグロブリン構成を行うために、整列化したクローンバッチ作成は重要な鍵となる作業であり、継続して整列化を進める必要がある。整列化クローンバッチ作成のためにも有効クローン率を高くする必要がある。現在のライブラリーのトータルバッチより精製したポリクローナルガンマグロブリンの安全性、有効性の検討を進めるとともに、来年度、数千個レベルの人工ガンマグロブリン整列化クローンバッチの作成を目指す。

## E. 結論

製剤化の障害となるヒスチジンタグを除いた改良型人工ポリクローナルガンマグロブリンライブラリーを作成したが、前年度のパイロットライブラリーよりも有効クローン率が減少し、ライブラリー構築方法の再考が必要となった。有効クローン率が低下したことにより、セミポリクローナルグロブリンバッチ構築のための整列化の障害ともなっている。内容および性状検討から今年度作成した人工ポリクローナルガンマグロブリンライブラリーは炎症性サイトカインや細胞シグナル因子に対するイデオタイプを多種類含んでおり、生体機能調節や病原性微生物の侵襲制御に効果を発揮

することが予想され、整列化ライブラリーの作成が有効な方法であることを示した。の開発が重要であると考えられる。最終年度においては、数千種類のイディオタイプを備えた整列化ライブラリー作成のため、効率的スクリーニングと多様性を維持したライブラリー作成が必要である。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Goedken M, McCormick S, Leidal KG, Suzuki K, Kameoka Y, Astern JM, Huang M, Cherkasov A, Nauseef WM. Impact of two novel mutations on the structure and function of human myeloperoxidase. *J Biol Chem.* 2007 Sep 21;282(38):27994-8003. Epub 2007 Jul 24.

### 2. 学会発表

1. 亀岡洋祐, 長田直樹, 田沼玲子, 平田誠, 高橋一朗, 笠間毅, 鈴木哲朗, 猪原登志子, 武曾恵理, 楠田潤, 橋本雄之, 鈴木和男、MPO リーダーペプチドは好中球顆粒に局在する, 第 30 回日本分子生物学会年会, 2007 年 12 月 横浜

2. 長田直樹, 橋本雄之, 楠田潤, 亀岡洋

祐, 田沼玲子, 平田誠, 高橋一朗, カニクイザル cDNA ライブラリーコレクションの拡充とその解析, 第 30 回日本分子生物学会年会, 2007 年 12 月 横浜

3. 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, MPO リーダーペプチドは MPO 活性制御に関与するか, 第 13 回 MPO 研究会, 2007 年 10 月, 広島

4. 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 MPO リーダーペプチドは好中球顆粒に局在する, 「炎症制御治療フォーラム千葉-2007」, 2007 年 7 月, 千葉

5. Yosuke Kameoka, Masahiro Furutani, Kazuo Suzuki, Evaluation of variety of artificial poly-clonal gamma globulin. International conference on Regulation of Inflammatory Diseases Vasculitis and Asthema-2008 in Chiba 2008 年 1 月, 千葉

## 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 特記事項なし

## 免疫グロブリンの *in vitro* での評価法の検討

主任研究者：鈴木和男 国立感染症研究所 科学技術特別研究員  
分担研究者：大野尚仁 東京薬科大学 教授  
分担研究者：宇野賀津子 ルイ・パストゥール医学研究センター 室長  
分担研究者：山本健二 国立国際医療センター 国際臨床研究センター長  
分担研究者：河内正治 国立国際医療センター 部長  
分担研究者：長尾朋和 千葉大学大学院医学研究員 特任講師

研究要旨：大量免疫グロブリン製剤 (IVIg) による治療法は、重症感染症や川崎病の治療として使用されている。また、本プロジェクトでは、ヒト型に特化した人工型ガンマグロブリンのプロトタイプ  
の作製にも成功しており、臨床応用に向けた体外診断法として *in vitro* での評価法の確立と作用機序の  
解析を目的とし、免疫細胞への作用血管内皮細胞への作用について検討した。

### A. 研究目的

血管炎、リウマチなどの難治性疾患への初期治療として免疫グロブリン製剤治療の必要性が増している。免疫グロブリンの人工化が望まれている。そこで、本研究では、今後の人工化免疫グロブリンの臨床応用に向け、川崎病、血管炎や腎炎における IVIg 治療による臨床結果の成績を基に、*in vitro* での体外診断法を開発し、臨床での治療効果判定・評価に利用できることを目的とする。

本年度は、特に、anti-MPO 抗体が糸球体血管内皮細胞への作用、Bio-Plex 法による多項目のサイトカイン・ケモカインの評価系およびヒト末梢血リンパ球の増殖能、単球の安定化、好中球脱顆粒、活性酸素産生をはじめとする評価系を検討する。さらに、臨床探索試験も含め臨床応用の準備を開始するとともに、人工免疫グロブリンの安全性の向上についても検討した。

### B. 研究方法

1) 免疫細胞への作用：本剤開発のためには様々な課題があり、その開発のためのツールとしての *in vivo*, *in vitro* 評価系の開発について検討した。*In vitro* での評価系では、ヒト末

梢血リンパ球の増殖能、単球の安定化、好中球脱顆粒、活性酸素産生をはじめとする評価系を構築した。

2) MPO-ANCA の直接的作用による糸球体血管内皮細胞の活性化：糸球体血管内皮初代培養細胞 (mGEC) に対して rabbit polyclonal anti-mouse recombinant MPO IgG (anti-rmMPO) を処理し、そのときの接着分子、サイトカイン、ケモカインの発現をリアルタイム RT-PCR、ELISA、Bioplex を用いて解析した。

3) 免疫グロブリンの血管内皮細胞への作用解析：免疫グロブリンの *in vitro* での評価系を確立するため、マウス血管内皮細胞樹立株 S1 細胞を用いて TNF- $\alpha$  による VCAM, E-selectin, ICAM-1 の発現を検討した。

(倫理面での配慮)

動物実験に関しては、動物実験計画書を所属機関の動物委員会（分担研究者においては当該機関の同等委員会）の許可を得て、動物愛護のもとに行った。