

gene is abruptly induced during the premeiotic S phase, after which it is constantly expressed until sporulation is finished (Fig. 1). Fluorescence microscopy of fixed cells expressing Mcp4 tagged with an HA epitope also confirmed this expression profile (Fig. 2). These observations suggest that Mcp4 may play a role in *S. pombe* meiosis. Indeed, we found that *mcp4*⁺ is required for the production of healthy gametes and that spores of *mcp4*Δ cells were sensitive to NaCl (Fig. 5D to F). Although a previous study sought to comprehensively identify and characterize the subcellular localization of *S. pombe* proteins involved in meiosis and mitosis (1, 25), Mcp4 was not mentioned. Thus, the subcellular localization described in this report is novel.

Examination of the Mcp4-3HA (Fig. 2) and Mcp4-GFP (Fig. 3) signals revealed that Mcp4 moves during meiosis from a scattered distribution in the cytoplasm to a pericellular localization at anaphase I. This meiotic redistribution of Mcp4 resembles that of F-actin (20) but differs in a few essential features, as follows. First, Mcp4 assembles around the nucleus earlier than F-actin, which still occurs as randomly scattered dots in the cytoplasm at anaphase I, as determined by Crn1-GFP and rhodamine-phalloidin signals (anaphase I panels in Fig. 3A and C). Second, Mcp4 and F-actin rarely colocalize during meiosis. Instead, they seem to occur side by side, even when both show an apparently random distribution in the cytoplasm. This is clearly revealed when F-actin assembles around the nuclear surface in metaphase II, at which point Mcp4 already shows a perinuclear distribution (metaphase II panels of Fig. 3A and C). Third, when the FSM is initiated, Mcp4 is sandwiched between F-actin and the nucleus (Fig. 3B). Analysis of Meu14 localization (Fig. 2C and D) suggested that F-actin, in turn, is sandwiched between Mcp4 and Meu14 (Fig. 3B). Subcellular localizations of Mcp4 and its related proteins at metaphase II and anaphase II are depicted schematically in Fig. 7.

Since the subcellular localization of Mcp4 after anaphase II partially coincides with that of the FSM, we examined whether Mcp4 is involved in FSM formation by examining the localization of Mcp4 in *meu14*Δ cells. Meu14 plays an essential role in the FSM by localizing at its border (18). Indeed, the localization of Mcp4 near the junctions of tubulin and the nuclei was largely disturbed in *meu14*Δ cells (Fig. 4A and B). This strain also showed aberrant Mcp4 localization prior to FSM engulfment of each of the daughter nuclei. Furthermore, *meu14*Δ cells also showed impaired F-actin positioning (Fig. 4C and D). Nonetheless, spore formation and spore viabilities were almost normal in *mcp4*Δ cells, indicating that Mcp4 plays no significant role in FSM formation. These observations suggest that the accurate positioning of Mcp4 at anaphase II depends on accurate FSM formation but that Mcp4 is not involved in FSM formation.

Although Mcp4 has a coiled-coil motif, it is unlikely that it interacts biochemically with other meiotic coiled-coil proteins, such as Spo15, Psy1, Sec9, and Meu14 (16, 18), that are essential for proper spore formation, because the localization patterns of these proteins during meiosis differ temporally and/or spatially from the localization pattern of Mcp4. Nonetheless, we found that the coiled-coil domain of Mcp4 is required for its proper localization (Fig. 6). Thus, Mcp4 may act in meiosis by associating with an as yet unknown partner via its coiled-coil

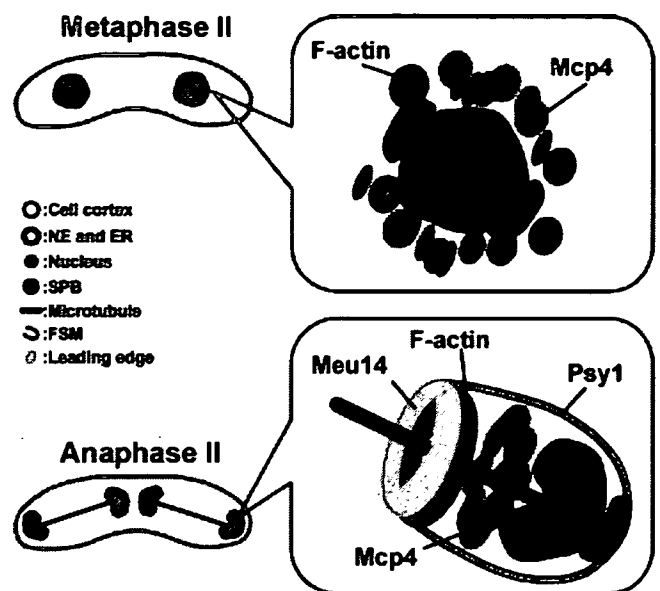


FIG. 7. Schematic presentations summarizing the subcellular localization of Mcp4 at metaphase II and anaphase II of *S. pombe* meiosis. The relative positions of the cell cortex, F-actin, nuclear envelope (NE), nucleus, ER, SPBs, microtubule, Psy1 at the FSM, and Meu14 at the leading edge of the FSM are depicted. The F-actin ring is sandwiched between the Meu14 and Mcp4 rings at anaphase II. See the text for details.

domain. The identification of this partner awaits additional studies.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank M. Yamamoto, C. Shimoda, and the Yeast Genetic Resource Center Japan (<http://bio3.tokyo.jst.go.jp/jst/>) for *S. pombe* strains. We are also indebted to O. Niwa and K. Gull for antibodies, P. Hughes for critically reading the manuscript, and T. Nakamura and T. Tougan for technical suggestions and helpful discussions.

This work was supported in part by Innovation Plaza Osaka of the Japan Science and Technology Agency (JST) and by grants-in-aid for Scientific Research on the Priority Areas Applied Genomics, Scientific Research (S), and Exploratory Research and for the Science and Technology Incubation Program in Advanced Regions from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan to Hiroshi Nojima.

REFERENCES

- Ding, D. Q., Y. Tomita, A. Yamamoto, Y. Chikashige, T. Haraguchi, and Y. Hiraoka. 2000. Large-scale screening of intracellular protein localization in living fission yeast cells by the use of a GFP-fusion genomic DNA library. *Genes Cells* 5:169–190.
- Gachet, Y., and J. S. Hyams. 2005. Endocytosis in fission yeast is spatially associated with the actin cytoskeleton during polarised cell growth and cytokinesis. *J. Cell Sci.* 118:4231–4242.
- Hagan, I., and M. Yanagida. 1995. The product of the spindle formation gene *sad1*⁺ associates with the fission yeast spindle pole body and is essential for viability. *J. Cell Biol.* 129:1033–1047.
- Hatanaka, M., and C. Shimoda. 2001. The cyclic AMP/PKA signal pathway is required for initiation of spore germination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 18:207–217.
- Humphries, C. L., H. I. Balcer, J. L. D'Agostino, B. Winsor, D. G. Drubin, G. Barnes, B. J. Andrews, and B. L. Goode. 2002. Direct regulation of Arp2/3 complex activity and function by the actin binding protein coronin. *J. Cell Biol.* 159:993–1004.
- Ikemoto, S., T. Nakamura, M. Kubo, and C. Shimoda. 2000. *S. pombe* sporulation-specific coiled-coil protein Spo15p is localized to the spindle pole body and essential for its modification. *J. Cell Sci.* 113:545–554.
- Itadani, A., T. Nakamura, and C. Shimoda. 2006. Localization of type I

- myosin and F-actin to the leading edge region of the forespore membrane in *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Struct. Funct.* **31**:181–195.
8. Karpova, T. S., S. L. Reck-Peterson, N. B. Elkind, S. M. Mooseker, P. J. Novick, and J. A. Cooper. 2000. Role of actin and Myo2p in polarized secretion and growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **11**:1727–1737.
 9. Kita, A., R. Sugiura, H. Shoji, Y. He, L. Deng, Y. Lu, S. O. Sio, K. Takegawa, M. Sakaue, H. Shuntoh, and T. Kuno. 2004. Loss of Apm1, the micro1 subunit of the clathrin-associated adaptor-protein-1 complex, causes distinct phenotypes and synthetic lethality with calcineurin deletion in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* **15**:2920–2931.
 10. Maier, P., N. Rathfelder, M. G. Finkbeiner, C. Taxis, M. Mazza, S. L. Panse, R. Hagenauer-Tsapis, and M. Knop. 2007. Cytokinesis in yeast meiosis depends on the regulated removal of Ssp1p from the prospore membrane. *EMBO J.* **26**:1843–1852.
 11. Mata, J., R. Lyne, G. Burns, and J. Bahler. 2002. The transcriptional program of meiosis and sporulation in fission yeast. *Nat. Genet.* **32**:143–147.
 12. Matsusaka, T., N. Imamoto, Y. Yoneda, and M. Yanagida. 1998. Mutations in fission yeast Cut15, an importin alpha homolog, lead to mitotic progression without chromosome condensation. *Curr. Biol.* **8**:1031–1034.
 13. Meier, M., and P. Burkhard. 2006. Statistical analysis of intrahelical ionic interactions in alpha-helices and coiled coils. *J. Struct. Biol.* **155**:116–129.
 14. Nabeshima, K., Y. Kakiyama, Y. Hiraoka, and H. Nojima. 2001. A novel meiosis-specific protein of fission yeast, Meu13p, promotes homologous pairing independently of homologous recombination. *EMBO J.* **20**:3871–3881.
 15. Nakamura, T., M. Nakamura-Kubo, A. Hirata, and C. Shimoda. 2001. The *Schizosaccharomyces pombe* spo3⁻ gene is required for assembly of the forespore membrane and genetically interacts with *psyl⁻*-encoding syntaxin-like protein. *Mol. Biol. Cell* **12**:3955–3972.
 16. Nakamura, T., J. Kashiwazaki, and C. Shimoda. 2005. A fission yeast SNAP-25 homologue, SpSec9, is essential for cytokinesis and sporulation. *Cell Struct. Funct.* **30**:15–24.
 17. Nakamura-Kubo, M., T. Nakamura, A. Hirata, and C. Shimoda. 2003. The fission yeast spo14⁺ gene encoding a functional homologue of budding yeast Sec12 is required for the development of forespore membranes. *Mol. Biol. Cell* **14**:1109–1124.
 18. Okuzaki, D., W. Satake, A. Hirata, and H. Nojima. 2003. Fission yeast meu14⁺ is required for proper nuclear division and accurate forespore membrane formation during meiosis II. *J. Cell Sci.* **116**:2721–2735.
 19. Pelham, R. J., Jr., and F. Chang. 2001. Role of actin polymerization and actin cables in actin-patch movement in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat. Cell Biol.* **3**:235–244.
 20. Petersen, J., O. Nielsen, R. Egel, and I. M. Hagan. 1998. F-actin distribution and function during sexual differentiation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell Sci.* **111**:867–876.
 21. Saito, T. T., T. Tougan, T. Kasama, D. Okuzaki, and H. Nojima. 2004. Mcp7, a meiosis-specific coiled-coil protein of fission yeast, associates with Meu13 and is required for meiotic recombination. *Nucleic Acids Res.* **32**:3325–3339.
 22. Saito, T. T., T. Tougan, D. Okuzaki, T. Kasama, and H. Nojima. 2005. Mcp6, a meiosis-specific coiled-coil protein of *Schizosaccharomyces pombe*, localizes to the spindle pole body and is required for horsetail movement and recombination. *J. Cell Sci.* **118**:447–459.
 23. Saito, T. T., D. Okuzaki, and H. Nojima. 2006. Mcp5, a meiotic cell cortex protein, is required for nuclear movement mediated by dynein and microtubules in fission yeast. *J. Cell Biol.* **118**:27–33.
 24. Sato, K., M. Sato, and A. Nakano. 2001. Rer1p, a retrieval receptor for endoplasmic reticulum membrane proteins, is dynamically localized to the Golgi apparatus by coatomer. *J. Cell Biol.* **152**:935–944.
 25. Sawin, K. E., and P. Nurse. 1996. Identification of fission yeast nuclear markers using random polypeptide fusions with green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:15146–15151.
 26. Sawin, K. E., and P. Nurse. 1998. Regulation of cell polarity by microtubules in fission yeast. *J. Cell Biol.* **142**:457–471.
 27. Shimada, M., K. Nabeshima, T. Tougan, and H. Nojima. 2002. The meiotic recombination checkpoint is regulated by checkpoint rad⁺ genes in fission yeast. *EMBO J.* **21**:2807–2818.
 28. Shimoda, C. 1980. Differential effect of glucose and fructose on spore germination in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Can. J. Microbiol.* **26**:741–745.
 29. Shimoda, C. 2004. Forespore membrane assembly in yeast: coordinating SPBs and membrane trafficking. *J. Cell Sci.* **117**:389–396.
 30. Tanaka, K., T. Kohda, A. Yamashita, N. Nonaka, and M. Yamamoto. 2005. Hrs1p/Mcp6p on the meiotic SPB organizes astral microtubule arrays for oscillatory nuclear movement. *Curr. Biol.* **15**:1479–1486.
 31. Taxis, C., C. Maeder, S. Reber, N. Rathfelder, K. Miura, K. Greger, E. H. Stelzer, and M. Knop. 2006. Dynamic organization of the actin cytoskeleton during meiosis and spore formation in budding yeast. *Traffic* **12**:1628–1642.
 32. Yamashita, A., and M. Yamamoto. 2006. Fission yeast Num1p is a cortical factor anchoring dynein and is essential for the horse-tail nuclear movement during meiotic prophase. *Genetics* **173**:1187–1196.

33 好中球の機能調節

1. 好中球と生体防御

好中球は、白血球の約60%を占め、生体防御機能の初期に働き、殺菌、殺ウイルス、殺真菌、殺腫瘍細胞など自然免疫 (innate immunity) の重要な役割を担っている。好中球系の防御細胞は、系統発生でみても昆虫や軟体動物にも存在しており、単細胞のアメーバの機能に似ている。マウスではヒトと

違い末梢白血球の約30%とその比率が大きく異なる。

好中球は細胞膜が柔軟で、細胞内骨格が発達し、素早い反応性を示す。刺激や反応に対応してアメーバ様の運動性を示す。その動きは、感染防御の先端での監視役として、異物に対して素早い反応に必要であり、その反応と運動によって異物を捕食 (食食, phagocytosis) し、消化するといった一連のダイナミックな機構全般に不可欠な要素として備わっている (図1)。Metchinicoffの好中球の発見から100年以上を経過し、好中球は、感染防御のマーカー、炎症細胞のマーカーとしての古典的研究から、好中球走化性因子の発見や細胞内情報伝達機構に始まる分子生物学の研究によって、目覚ましい好中球の機構解析と臨床応用の研究へと発展し、好中球はさまざまな機能面をもつことが明らかにされた。なかでも、レセプター、リガンドの反応から異物認識・粘着にはじまる細胞内情報伝達の反応の解析は、細胞内情報伝達機構の解析研究のさきがけ的なものになった。一方、この機構にかかわる機能が過剰になることで、本来の好中球機能の役割が生体側にとって障害になることも明らかになってきている。また、パンデミックインフルエンザ肺炎の際にも、好中球の関与が重要なキーともなっており、今まであまりかえりみられなかった好中球の生体での複雑な役割が明らかになってきている。

2. 好中球の細胞としての機能の特殊性

好中球を細胞の機能面からみると、粘着 (図1 A)、遊走 (走化能) (図1 B)、食食 (図1 C)、脱顆粒 (酵素放出能)、殺菌の機能を持ち、それぞれ順次ステップを追って生体防御機能の役割を担っている。

1) 粘着機能

好中球は、末梢血液を循環している時は血管内皮細胞に粘着しないが、いったん感染、炎症などの刺激を受けると活性化され、血管内皮細胞に粘着し、ローリングしながら血管内皮細胞をすりぬける。そ

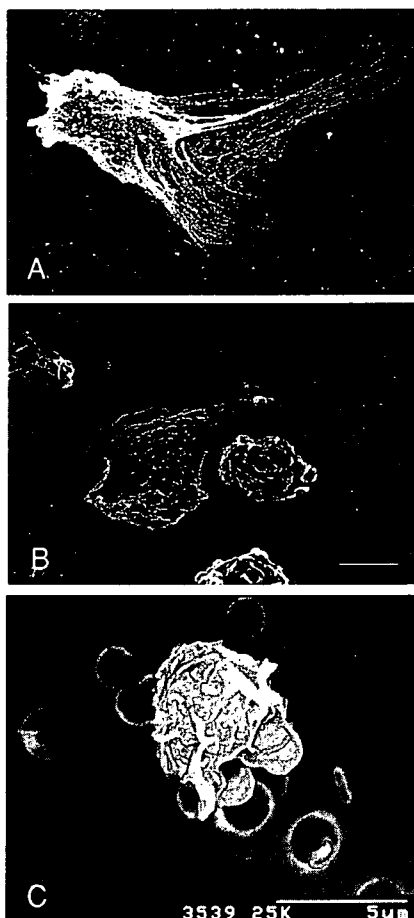


図1 好中球の各ステップでの機能
A: 粘着, B: 遊走 (走化能), C: 食食.
bar: 1 μm (A, Bとも).

れに加え、好中球が血管内皮細胞の外を通るだけでなく、内皮細胞が好中球を取り込み（呑み込み）、血管外へと放出するといった報告もある。このステップは、好中球が生体防御細胞として働く際の重要な第一歩である。この粘着という好中球機能は、血管内皮細胞への粘着のみではなく、その他の好中球機能の全般にわたって重要な役割に参与している。

2) 遊走・走化能

血管外へ出た好中球は、感染部位や炎症部位へと移動する。この機能のうち細胞の移動機能を「遊走」という。一方、感染部位や炎症部位へと方向性をもって遊走することを「走化性」という。この走化性は、方向性をもった遊走であるので、移動先の方向をキャッチする必要がある。好中球が方向をキャッチするには、局所からの情報を得る必要があり、好中球は、局所から産生される種々の物質に反応して方向を決める。方向を決める因子には、補体成分 C5a、細菌産生ペプチド fMet-Leu-Phe、ロイコトリエン B₄、インターロイキン 8 (IL-8)、LECT 2 などが走化性因子として明らかにされている。また、これらの因子によって、好中球が活性化される。これらの走化性因子はリガンドとして、好中球表面のレセプターにある補体成分 C5a レセプター、fMet-Leu-Phe レセプター、ロイコトリエン B₄ レセプター、IL-8 レセプターなどに結合する。これらのレセプターと結合することで好中球細胞内へと情報が伝達され、好中球が活性化される。この情報伝達に呼応して好中球の膜の流動性が上昇する。遊走の走化性には、膜の流動性が不可欠である。

3) 食機能—食食作用

感染部位へ好中球が到達すると、そこに増殖している細菌・ウイルス・真菌を即座に食べる。この現象を「食作用」あるいは「食食」とよんでいる。好中球が生体防御機能を発揮するには、細菌、ウイルス、真菌を細胞内に食食して物理的に封じ込め、細菌・ウイルス・真菌の生体内での増殖を抑制することで役割を果たしている。この機能にも好中球の粘着機構と膜の流動性が関与している。すなわち、特異的レセプターを利用した接着と非特異的な接着にはじまる食食機能である。食食しながら、細菌・ウイルス・真菌などを食胞（ファゴソーム）にとじこめる。この反応は、かなり機敏で秒から分単位での反応である。

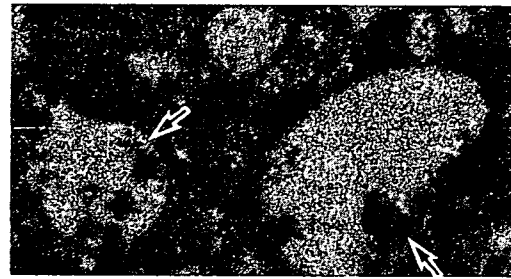


図2 インフルエンザウイルスの不活化・分解

4) 脱顆粒・酵素放出と活性酸素産生

好中球は、細菌を食食後、細菌、ウイルスおよび真菌を不活性化することが生体防御の主たる役割である。インフルエンザウイルスも不活化分解して処理することがわかっており（図2）、1918年のパンデミック（スペイン風邪）の場合の好中球の役割も大きいと考えられている。好中球は、食食して食胞をつくると同時に好中球内の顆粒（ライソソームを含む4種の顆粒）と順次融合してファゴライソームを形成する。そして、myeloperoxidase (MPO) など顆粒内の消化・不活化酵素をそのファゴライソームの中に放出する。これと同時に、活性酸素も産生し、不活化して、殺細菌、殺ウイルス・殺真菌をする。細菌由来の分子や生体内の補体、炎症性サイトカイン、活性化因子などレセプターのリガンドが結合した好中球は、その情報を細胞内の蛋白質をリン酸化反応などを通じて、細胞内に瞬時に伝達する。その典型的なものが活性酸素産生や脱顆粒・酵素放出する一連の細胞内情報伝達経路である。このように、好中球は、生体防御機能として、活性化されてから殺菌するまでの機能を有し、かつ、活性化が即時に起こる。このダイナミックな機能の発現は、生体防御に必要である。

5) 好中球の活性化によって MPO-H₂O₂ 系が作動して生体防御に関与する¹⁾

好中球は、MPO-H₂O₂ 系を利用して生体防御に作動する。感染によって MPO などが血液中に放出され、炎症がおさまると同時にクリアされ、CRP と同様の血中レベルの変動を示す。これは、好中球の活性化状態と関連すると推定されている。MPO 分子の構造は、light chain (14 kDa) と heavy chain (59 kDa) の2分子に heme 2 分子をもつ 158 kDa のヘテロテトラマーの糖蛋白質で、等電点 10.3 以上で、第17染色体にコードされている。MPO は、NaCl と H₂O₂ を基質として OCl⁻ を産

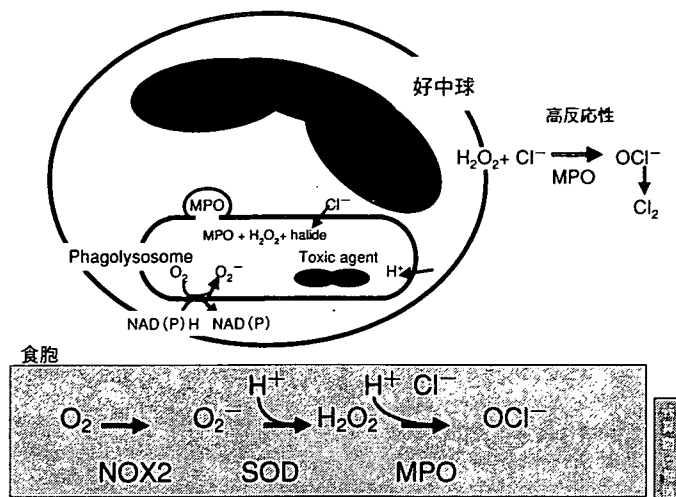


図3 MPOは、NaClとH₂O₂を基質としてOCl⁻を産生する

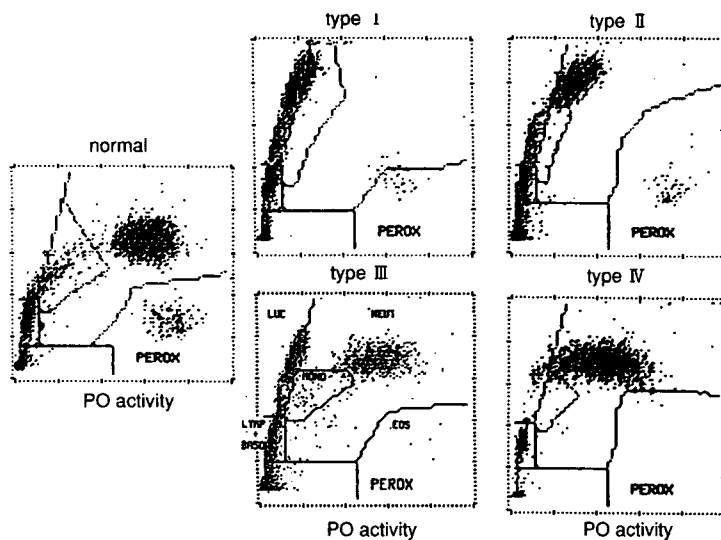


図4 MPO Index (MPIX) からの欠損型の4つの分類

生する(図3)。活性酸素産生酵素NADPH oxidaseに加え、MPOの不全症は真菌症に重要であることが判明している。また、コードされている遺伝子の異常のみならず、遺伝子発現調節部位で調節している転写因子の機能不全によってもMPO分子群の遺伝子発現の異常が起こる。

日本人における遺伝的MPO欠損頻度は、臨床血液検査機器から得られるMPO Index (MPIX)から欠損型が4つに分類されている(図4)。完全欠損の発生頻度は施設平均では1人/57,135人である²⁾。一方、欧米の解析からは、イタリアでは、1人/4,000人であり、米国では、1人/2,000~4,000

人と報告されている。また、その原因になっている遺伝子変異は、これまでR569W, Y173C, M251T, G501Sが報告されている。

3. 血管傷害や慢性疾患を誘導する好中球の活性化状態

上述したように、MPO-H₂O₂系を利用して好中球は、生体防御に作動するが、条件・状況によって生体側に不利な細胞に傷害を引き起こし、炎症を惹起する。血管炎の患者の血中には、高MPO活性とともに、活性化好中球が循環していることが、川崎病や血管炎の好中球の機能の解析から明らかになっ

ている。この活性化好中球は、続発する炎症や感染によって血管傷害の誘発に関与すると推定されている。

好中球の活性化は血管炎発症と関連がある

生体防御の機能が亢進下状態で、活性化されたままの状態では生体側の細胞傷害をもたらす結果になる。すなわち、好中球の生体防御という一義的な機能が、ややもすると、条件・状況によって生体側に不利な細胞傷害を引き起こし、炎症を惹起する結果になる。好中球のライソゾーム酵素 MPO やプロテアーゼなどの好中球顆粒成分が、感染や炎症の惹起によって血液中に放出される。血管炎の患者の血中には、高 MPO 活性とともに、活性化好中球が循環していることが、川崎病や腎炎患者の好中球の機能の解析から明らかになっている。この活性化好中球は、続発する炎症や感染によって血管傷害の誘発に関与すると推定されている。

血管炎の組織には、炎症細胞の浸潤があり、マクロファージ、好中球、リンパ球が観察される。顕微鏡的多発動脈炎 (MPA) などの顕微鏡所見では多くの好中球浸潤が認められることがある (図 5)。好中球が、その抗体 ANCA とともに血管炎に関与していることが十分予想される。好中球や ANCA 以外にも、血管炎の病因がかかわるリスク因子とし

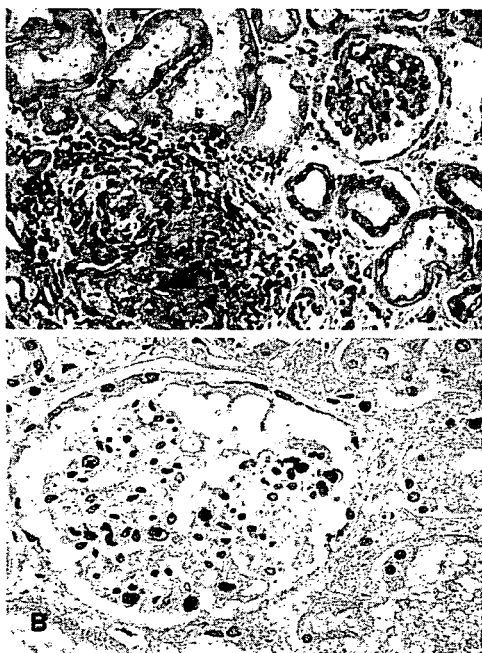


図 5 顕微鏡的多発動脈炎 (MPA) における好中球浸潤像
A: HE 染色, B: MPO 抗体染色。

て、ANCA 以外の自己抗体、IL-8、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、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トリガーや反応として連鎖していると推定されている。

4. 好中球ライソゾーム酵素 MPO の抗体である MPO-ANCA が血管炎と相関を有する

MPO-ANCA は、血管炎を呈する疾患にその上昇が認められ、疾患の臨床マーカーとして利用されている好中球細胞質抗体である³⁾。血清中の MPO-ANCA 陽性の対象疾患として、川崎病や腎炎などの血管炎が主であるが、関節リウマチや SLE においても MPO-ANCA が高値を示すケースがあり、MPO-ANCA を呈する血管炎では、好中球の活性化が関与している。

MPO が MPO-ANCA の抗原であることを証明されている。MPO は、MPO-ANCA の抗原として作動する。病態と密接に関与する MPO-ANCA は、その抗原・抗体反応と、それに続く免疫複合体によって好中球が活性化され、その状態が持続することで病態の重篤化を招くのではないかと考えられている。筆者らの MPO 欠損マウスを用いた実験において MPO-ANCA の激減と冠状動脈炎の発症が抑制されたことから、MPO が抗原となり MPO-ANCA が産生され、これに呼応して血管炎が発症することが裏づけられている。

1) MPO-ANCA と病態との関連

これら疾患患者の血清中の MPO-ANCA の抗体価だけでは、必ずしも疾患の病態と連動していないことがわかっており、病態と密接に関与する MPO-ANCA は、その抗原・抗体反応と、それに続く免疫複合体によって好中球が活性化され、その状態が持続することによって、病態の重篤化を招くのではないかと考えられている。

2) MPO-ANCA エピトープ解析用パネルの作成と血管炎関連 MPO-ANCA 抗体のエピトープ解析

病態と関連した MPO-ANCA の関与について解析するためには、抗体による MPO 分子との反応部位 (エピトープ) を特定することと、反応性・血管傷害に関わる抗体を特定することが必要である。また、好中球を活性化する抗体の性状と病態に連動する好中球の活性との関係を特定することも重要な問題である。そこで、血管炎の病態を判定するための

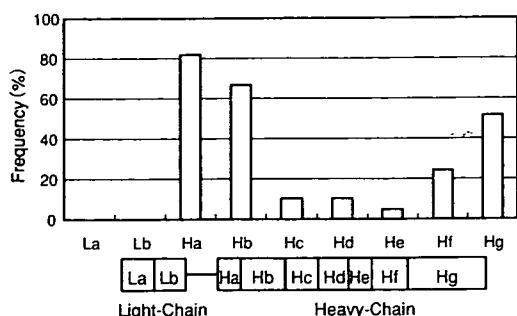


図6 病体に関連する MPO-ANCA エピトープ

MPO-ANCA エピトープ解析用パネルが作製されている⁵⁾。

E. coli を用いた deletion mutants のリコンビナントフラグメント (MPO 分子を 7 部分に分けたリコンビナント MPO 断片) のパネルセットを使って、MPO-ANCA 抗体のエピトープを解析し、特定の反応部位が病態と関連することが明らかになっている。また、このセットを使った MPO-ANCA エピトープ解析用 ELISA 法を用い、血管炎関連患者血清の MPO-ANCA 抗体のエピトープの解析により、MPO の L 鎖とは全く反応せず、主として H 鎖の N および C 末端に単独で反応するエピトープをもつ MPO-ANCA 抗体が重症化と関連する。この解析結果は、特定のモノクローナル抗体が重症化と関連していることを示す。さらに、「厚生省・難病血管炎班」において、種々の血管炎患者の MPO-ANCA 陽性を認めた 176 例の血管炎患者血清の MPO-ANCA のエピトープを解析し、約 70% の血管炎患者の血清はエピトープを示す。特に、多発動脈炎 (PN) および MPA 患者の血清は MPO の H 鎖の N および C 末端に単独で反応するエピトープをもつモノクローナル抗体であり、他の血管炎の血清の MPO-ANCA は、末端ではない部位のエピトープ、2 つ以上すべてに反応するエピトープを示すように (図 6)、クローナリテは血管炎疾患および病態と関連があることを示唆している。これらの結果は、治療による病態の評価基準作成や血管炎の重症度の評価に重要であると考えられる。

3) MPO-ANCA エピトープと好中球活性化による血管炎進行

エピトープ解析から MPO-ANCA のモノクローナル抗体が血管炎の進行と関わることがわかった。また、Fcγ レセプター欠損マウスでは、腎炎が発症しないことから、好中球の活性化に関与する抗体

および免疫複合体は特異性が高いモノクローナル抗体であると推定されている。一方、川崎病の治療に用いられているグロブリン製剤は、MPO-ANCA を含んでいるが、ポリクローナルであることが判明している。健常者血中にも MPO-ANCA が含まれているのと同様である。これらのことから、病因性の高いモノクローナル抗体が、ポリクローナルによって弱められていることが治療に有効性を示す一因である可能性もある。この過剰反応を抑制する治療法も検討されている⁶⁾。

5. 好中球活性化によって誘導される血管炎モデルマウス

血管炎の治療や、病因を解析する上で重要なのが病態モデルマウスを用いた研究である。腎炎や血管炎を有する NZB/WF 1, MRL, SCG, IRF-8/ICSBP-KO マウスや *Candida albicans* 由来分子の膜成分 (CADS) や water soluble glycoprotein (CAWS) によって誘導される冠状動脈血管炎マウスがある。また、MPO-ANCA 関連血管炎マウスとして、SCG/Kj マウスの研究が進んでいる。これらのマウスは、好中球機能が亢進している。

1) 急性進行性糸球体腎炎 (RPGN) の疾患モデルの SCG/Kj マウスの好中球機能

SCG/Kj マウスは、半月体形成性糸球体腎炎を高率かつ急速に自然発症し、その病態の発症・進行においては、好中球機能および MPO-ANCA が関与している。SCG/Kj マウスは、リンパ節腫脹が観察され、MPO-ANCA が腎炎の発症とともに増加して半月体形成を伴う腎炎を早期に自然発症する。尿蛋白量から、腎炎進行度を 3 段階に分類 (発症前期段階: 30 mg/dl 以下, 初期段階: 3~300 mg/dl および後期段階: 300 mg/dl) して、末梢好中球数、好中球機能、血清 MPO-ANCA 値および腎臓への好中球の浸潤度を調べると、初期段階では無刺激の好中球からの MPO 放出が高値を示すが、細菌由来走化性ペプチド fMet-Leu-Phe 誘導の MPO 放出では、腎炎の 3 段階すべての時期を通じて亢進しており、時間差がみられない。血清中の MPO-ANCA 値は、初期段階から高値を示す。また、糸球体への好中球浸潤とも相関があり、腎臓障害スコアおよび半月体形成スコアとも弱いながらも相関が認められる。初期段階において、無刺激 MPO 放出が、糸球体への好中球浸潤、腎臓障害スコアおよび半月体形成スコアと有意に関連しており、腎炎発症

と進行には、活性化好中球が関与していることが示唆される。以上から、糸球体腎炎の発症 SCG/Kj マウスでは、末梢血中に活性化好中球数が増加し、炎症を拡大し、腎臓への活性化好中球浸潤が半月体形成に重大な影響を及ぼしていると推定される。また、好中球が放出するリスク分子により正常細胞破壊や connective tissue 破壊が起こる。このように、活性化好中球によって腎臓障害が進行するものと推定される。また、一方、ごく最近 SCG/Kj マウスの解析から MPO-ANCA の責任遺伝子座 (*Man-1* および *Man-2* と命名) も明らかにされている。

この病態モデルマウスで示したように、RPGN の発症・進行には、好中球活性化因子がキーになると思われる。しかし、好中球の活性化因子は特定されていない状況である。それらの活性化因子の産生や好中球の活性化がどのように調節されているか、また、なぜ、SCG/Kj マウスでは、それらの因子の産生や応答性に“みだれ”があるのかを、好中球活性化を指標として解析していく必要があるが解明されていないのが現状である。

2) 真菌分子が誘発する川崎病様冠状動脈炎の疾患モデルマウスの好中球機能

真菌誘発の血管炎の治療や、病因の解析に欠かせないモデルマウスの一つに、CADS 誘発の冠状動脈炎マウスがある。このマウスは、血管炎発症とともに、血中に MPO-ANCA が上昇する。MPO 遺伝子欠損マウスでは、血管炎の発症とともに MPO-ANCA が低下することから、MPO が主たる抗原になって、血管炎を発症に関与していることが明らかになっている (59 章参照)。病理像から川崎病様モデルマウスとして注目されている。野生型マウス (C57 BL/6) において、冠状動脈血管炎発症率と MPO-ANCA 値に正の相関が認められ、CADS 抽出物誘導の冠状動脈血管炎の発症に MPO-ANCA 産生の関与があり、遺伝子座の解析が報告されている。最近、さらに高率に血管炎を誘発する CAWS 冠状動脈炎をマウスに誘発することが明らかにされ、その好中球活性化機構の関与があることがわかってきている。

まとめ—好中球は多種多様の機能をもつ

好中球は、自然免疫 (innate immunity) の重要な役割を担い、感染防御の先端での監視役として異物に対してすばやく反応し、感染防御のマーカー、炎症細胞のマーカーとなっている。また、強い防御能のためその機能が過剰になると、生体側にとって障害になる。好中球機能による生体側に向けた細胞・組織の傷害性は、種々の急性、慢性疾患の要因の一つとなっており、今後も、好中球機能の生体防御においてさまざまな役割が追加されると思われる。

[鈴木和男]

参考文献

- 1) Petrides PE, Nauseef WM, editors: The peroxidase multigene family of enzymes, Springer-Verlag, Berlin, 2000.
- 2) Nunoi H, Kohi F, Kajiwaru H, Suzuki K: Prevalence of inherited myeloperoxidase deficiency in Japan, *Microbiol Immunol*, **47**: 527-531, 2003.
- 3) Gross WL, Schmitt WH, Csernok E: ANCA and associated diseases: immunodiagnostic and pathogenetic aspects, *Clin Exp Immunol*, **91**: 1-12, 1993.
- 4) Proceedings of 4th International Peroxidase Meeting-Kyoto: *Jpn J Infect Dis*, **57**: S 1-S 55, 2004.
- 5) Tomizawa K, Mine E, Fujii A, Ohashi Y, Yamagoe S, Ishida-Okawara A, Hashimoto, Y Ito M, Tanokura M, Yamamoto T, Arimura Y, Nagasawa T, Mizuno S, Suzuki K: A panel set for epitope analysis of myeloperoxidase (MPO)-specific anti-neutrophil cytoplasmic antibody MPO-ANCA using recombinant hexamer histidine-tagged MPO Deletion Mutants, *J Clin Immunol*, **18**: 142-152, 1998.
- 6) Ito-Ihara T, Ono T, Nogaki F, Suyama K, Tanaka M, Yonemoto S, Fukatsu A, Kita T, Suzuki K, Muso E: Clinical efficacy of intravenous immunoglobulin for patients with MPO-ANCA-associated rapidly progressive glomerulonephritis, *Nephron Clin Pract*, **102**: c 35-c 42, 2005.

64 炎症における出血と血栓

好中球は末梢血白血球の中で最も大きな population をもつだけでなく、食細胞 (phagocyte) として外来侵入物、病原体に対抗して生体防御機構の第一線で機能する。その一方で、好中球の活性化が制御されないことにより臓器障害の病態形成に関与している疾患も多い。例えば、敗血症による播種性血管内凝固症候群 (DIC)、成人呼吸窮迫症候群 (ARDS)、肺気腫、ある種の血管炎や腎炎においては血管障害、臓器障害の担い手となる。また、関節リュウマチ (RA) や全身性エリテマトーデス (SLE)、潰瘍性大腸炎という自己免疫疾患においても、病態の悪化や合併する血管炎の急性期に好中球の活性化が関与する可能性が指摘され、白血球除去療法が病勢の改善に奏効するという報告は最近のトピックスの一つである。これらの病理組織をみると炎症細胞浸潤に加え、しばしば血栓と出血という一見相反する像が同居している場合があることに気づく。この現象を、好中球の cytotoxicity による血管整合性の破壊という観点から眺めてみる。

たとえば、敗血症による DIC という病態は全身的炎症反応 (SIRS) の一側面ととらえられる考え方が一般的となっており、臓器障害を抑制するためには凝固系に直接影響する抗凝固療法、抗血小板療法といった治療だけではなく、血栓の根本的原因となる白血球の活性化と血管内皮障害のレベルでの治療が必要と考えられてきている。SIRS において血管内皮障害をもたらす因子として好中球の活性化は重要であり臓器障害を抑制するための治療の標的となりうる。好中球はさまざまな接着因子を発現調節しそれらを介して血管内皮、血小板、細胞外基質、補体、免疫グロブリンなどと相互作用して血管外遊走、貪食などにより生体防御に貢献する一方、炎症における好中球の活性化の異常は本来抗血栓性を保持する血管内皮細胞に障害を与え、微小血管内血栓や出血による臓器障害をもたらす。

それでは、DIC においてなぜ出血と血栓が同時に起こるのか？ 我々は学生時代、出血を起こすのは微小血栓に消費されることによる血小板の減少と

凝固因子の枯渇によると習った。しかし、炎症研究が進むにつれこれがすべてのメカニズムでないことがわかってきた。好中球の cytotoxicity による vascular integrity (血管整合性) の破壊が局所的にも起こっているのである。臨床の現場では、血小板減少に対し血小板を輸血すべきなのか、あるいは血栓形成を抑制するために抗凝固療法を施すべきなのかに迷うことがありその一般的見解も炎症研究が進むにつれて変化しつつある。また、そのような抗凝固、止血療法は姑息的なものであり、FOY、FUT などのプロテアーゼ阻害薬が進んで用いられるが、これは凝固因子のカスケードに関与するプロテアーゼだけでなく、好中球エラスターゼを阻害することにより血管障害を抑制する。いずれにしても、DIC からの回復に最も重要なのは原因疾患の早期治療であるが、これは好中球を持続的に活性化する原因を早期に除去するというきわめて理にかなった解釈ができる。

DIC における局所血管では何が起こっているかをさらに詳細に調べるため、我々は Local Shwartzman-like Reaction: LSR モデルを用いて研究を進めた。これは、背部皮膚下に LPS を投与後 24 時間後に同部位に TNF を投与することにより、微小血管の出血と血栓を伴う白血球破砕性血管炎をきたすモデルである。いわゆる DIC の血管病変を局所的に再現するとされるモデルである。好中球を免疫学的に除去したマウスでは LSR は起こらないことから、好中球依存性の血管炎モデルであるといえる。我々は、白血球接着因子 Mac-1 (CD 11 b/CD 18, CR 3) と好中球から脱顆粒されるエラスターゼがこの血管障害にきわめて重要な役割を果たしていることを報告したのでその一部を紹介する。

Mac-1 とは β_2 インテグリンに分類される白血球接着因子であり、好中球、単球、一部の T 細胞、肥満細胞などに発現している。好中球が活性化されると Mac-1 は細胞表面に移動しさまざまなリガンドを相手に細胞接着のみならずいろいろな機能を発

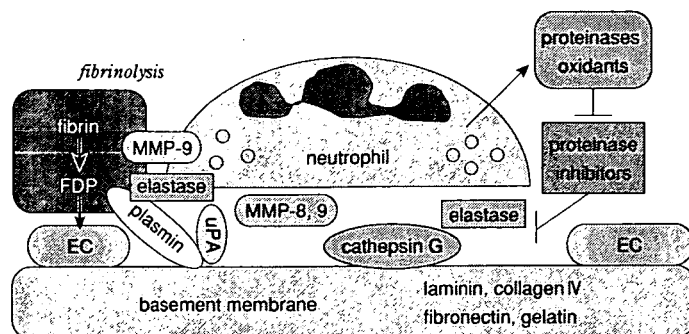


図1 好中球が血管壁との間に形成する閉鎖空間
出血性血栓性血管炎 (Local Schwartzman Reaction) モデルにおける Mac-1 と好中球エラスターゼ. EC: endothelial cells.

揮する。特に炎症の場では白血球の血管壁への接着と脱顆粒の制御に重要な役割を果たす。同時に、好中球が食細胞として、オプソニン化された病原体を貪食する際に必要な補体C3受容体 (CR3) でもある。その際、貪食後の好中球のアポトーシスを促進し、好中球の寿命を決定する因子としても注目されている^{1,2)}。

好中球は補体にオプソニン化された標的を食細胞として貪食し、phagosomeを形成して内部に活性酸素やプロテアーゼを放出することにより病原体を分解処理する (phagocytosis)。その過程には好中球細胞骨格の再構成がダイナミックに起こっている。ところが、その標的が血管内皮細胞のようにあまりにも大きくて飲み込めない相手の場合には、好中球上の Mac-1 が血管壁に沈着した補体を認識してインテグリンシグナルを細胞内に送り自身の細胞骨格を再構成することにより標的に張りついて、好中球と血管壁との間に閉鎖空間を形成する (frustrated phagocytosis)。この空間は、血清中に豊富に存在するアンチトリプシン ($\alpha 1$ AT) (エラスターゼインヒビター) のようなプロテアーゼ阻害物質の影響から逃れ、放出された活性酸素種やプロテアーゼが濃縮されて細胞障害性に働くことのできるようになる“死の空間”である (図1)。

エラスターゼはカテプシンGとともに好中球の azurophil 顆粒に貯蔵されている代表的なセリンプロテアーゼであり、さまざまな物質を基質として分解する。一般的な性質は他書に委ねたいが、特筆すべきことは古典的に知られているようにエラスチンなどの細胞外基質を分解して血管壁の破壊を行うだけでなく、抗凝固に関係する因子 (プロテイン S、

TFPI) を分解することにより凝固系を加速する一方、フィブリン血栓を融解する線溶の働きも有している。また、サイトカインやケモカインを標的として分解することにより炎症反応を修飾する。好中球が活性化されると、脱顆粒シグナルによりエラスターゼは細胞表面に輸送され、細胞外へ放出されるものと、細胞外の表面に結合するものとに分かれる。好中球は上記の閉鎖空間においてエラスターゼの細胞障害性を高めるために、さまざまな手立てを講じる。好中球から放出される活性酸素種や MMP (マトリックスメタロプロテアーゼ) はアンチトリプシン ($\alpha 1$ AT) などのエラスターゼインヒビターを失活し、エラスターゼの活性を維持する方向に働く。遊離されたエラスターゼは血清中に豊富に存在する $\alpha 1$ AT などのエラスターゼインヒビターによって即座に失活するのに対し、細胞表面結合型エラスターゼは抵抗性を示しその活性を保持する。最近になって、エラスターゼを細胞表面に保持しているのは、エラスターゼ活性により立体構造を変化させた Mac-1 であり、Mac-1 に結合したエラスターゼはインヒビターから守られてその蛋白分解酵素活性を維持しているというメカニズムが報告された³⁾。すなわち、Mac-1 とエラスターゼは好中球の細胞障害性を発揮する上できわめて密接な関係にあることを示している。

LSR において、好中球上の接着因子である Mac-1 あるいは好中球エラスターゼ (NE) KO マウスでは出血および血栓形成は完全に抑制された。さらに、Mac-1 の下流シグナルである Src-family kinase である Hck と Syk tyrosine kinase の KO

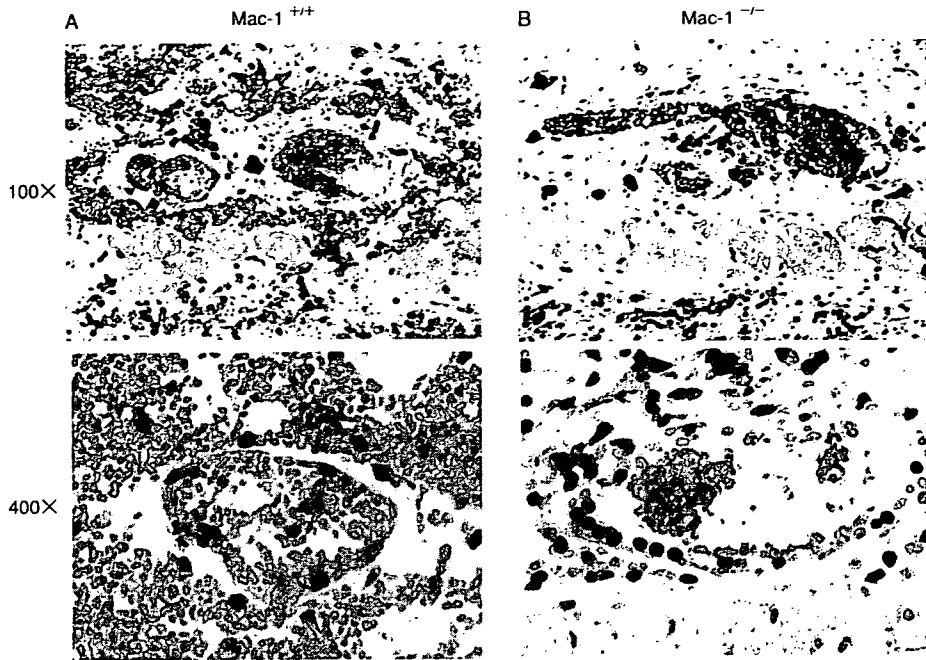


図2 エステラーゼ反応による好中球染色 (文献4を一部改変)

A: 野生型マウス, 毛細血管壁に flat に接着する好中球 (著しい出血=血管外への赤血球の逸脱), B: Mac-1 欠失マウス, 血管壁に接着せず円形を保つ好中球 (出血は認めない).

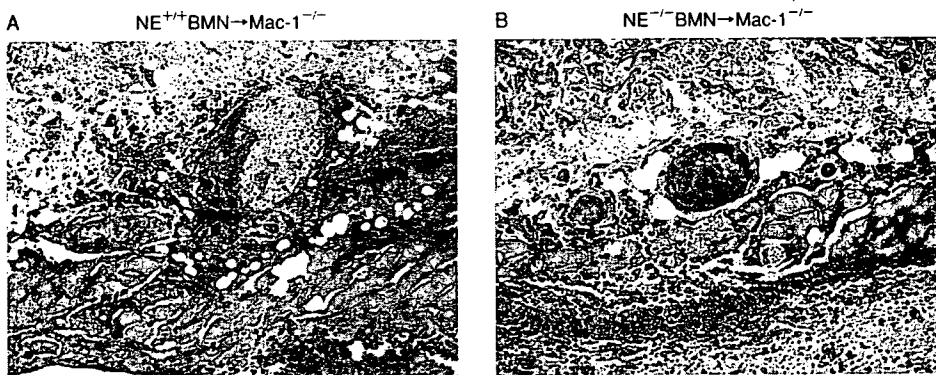


図3 骨髄好中球によるクロスコンプレメンテーション (文献4を一部改変)

A: NE^{+/+}の骨髄好中球を Mac-1 KO マウスに輸血. 著しい血栓形成と出血を認め毛細血管は破裂し, 血管整合性は破壊されている. また, 血栓は活性化好中球を含んでいる. B: NE^{-/-}の骨髄好中球を Mac-1 KO マウスに輸血. うっ血は認めるが出血や血栓はなく血管整合性は保たれている. 好中球の浸潤は A と同様に認められる.

マウスでも血管炎は完全に抑制されたことから, これらの活性化が Mac-1 依存性の NE 放出を制御することにより血管障害をもたらすことがわかった. 興味深いことに, Mac-1 あるいは NE KO マウスにおいても好中球の集積は同様に認められた (図2). すなわち, 好中球の recruitment と cytotoxicity は独立に考えられるべき事象であることを示唆し

た⁴⁾. 我々は, Mac-1 と エラスターゼ が実際に *in vivo* で細胞障害性を発揮するのに密接な関係であることを示すため, クロスコンプレメンテーション法を用いた実験を行った (図3).

以上のように, 活性化好中球において Mac-1 は細胞骨格を再構成して標的との間に閉鎖空間を形成

し、その空間へのエラスターゼの放出を促進し細胞表面に結合させてエラスターゼの活性を維持するという巧妙なメカニズムで血管、組織障害を発揮するというきわめて巧妙な機能を有しているのである。

[平橋 淳一]

参考文献

- 1) Zhan B, Hirahashi J, Cullere X, Mayadas TN: Elucidation of molecular events leading to neutrophil apoptosis following phagocytosis: cross-talk between caspase 8, reactive oxygen species, and MAPK/ERK activation, *J Biol Chem*, **278**: 28443-28454, 2003.
- 2) Mayadas TN, Cullere X: Neutrophil beta 2 integrins: moderators of life or death decisions, *Trends Immunol*, **26**: 388-395, 2005.
- 3) Zimmermann F, Lautenschlager K, Heppert V, Wetzensen A, Hansch GM, Wagner C: Expression of elastase on polymorphonuclear neutrophils *in vitro* and *in vivo*: identification of CD 11 b as ligand for the surface-bound elastase, *Shock*, **23**: 216-223, 2005.
- 4) Hirahashi J, Mekala D, Van Ziffle J, Xiao L, Saffaripour S, Wagner DD, Shapiro SD, Lowell C, Mayadas TN: Mac-1 signaling via Src-family and Syk kinases results in elastase-dependent thrombohemorrhagic vasculopathy, *Immunity*, **25**: 271-283, 2006.