

強度が治療前で強く、治療1および6週間後では減弱している p2503、同じくイオン強度が治療前と治療後1週間では同等に強く6週間目では減弱している p1737 と p7767、また、イオン強度が治療前、治療後1週間、治療後6週間と遞減する p1523 の4ペプチドが、治療により減弱するペプチドとして検出された。一方、イオン強度が治療前から治療後1週間、6週間と遞増する p1625、治療後6週間で強度の増加する p2115、治療後イオン強度が増加し1週間目と6週間目で同程度の強度を示す p7160 の3ペプチドが治療により強度の増加するペプチドとして検出された。

次に治療前血清中のペプチドの強度と臨床症状との相関を検討した結果、p1523の高い群では末梢神経障害と腎障害が有意に高頻度に出現していた。同様に、p1737とp7767のペプチド強度の高い群では末梢神経障害が、p2115とp2503のペプチド強度の高い群では腎障害が有意に高頻度に出現していた。

以上の結果より、MPO-ANCA関連血管炎患者血清中には治療により量的変化を示すペプチド群が存在し、かつ、個々のペプチドにより、末梢神経障害と腎障害など特定の症状と相関のあるものが存在することが判明した。

D. 考察

血管炎関連分子を検索することは、血管炎の病因解明による新規治療法の開発と、診断あるいは治療モニタリングなど臨床経過把握において重要である。本研究では、これまで技術的に顧みられることのなかった分子量約10kD以下の小ペプチドに着目し、疾患特異的小ペプチドの検出法の確立し、MPO-ANCA関連血管炎で治療により増減する血清ペプチドを検出しえた。個々のペプチドのイオン強度は末梢神経障害と腎障害など特定の症状と相関することから、病因論的意義を持つ可能性も考えられた。今後、臨床経過予測などに役立てると共に、検出ペプチドのアミノ酸配列を同定し、病態形成における意義を明らかにしたい。

E. 結論

ペプチドの網羅的解析法、すなわちペ

プチドミクスより得られたMPO-ANCA関連血管炎患者血中に出現するペプチドは、血管炎の病因関連分子として、診断あるいは治療モニタリングなど臨床経過把握分子として有用である可能性があり、MPO-ANCA関連血管炎をはじめとする血管炎の克服に貢献しうる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

1. Matsuoka A, Kato I, 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.* 38(1):17-24:2005
2. Orita M, Masuko-Hongo K, Yotsuyanagi H, Matsui T, Suzuki-Kurokawa M, Nishioka K, Kato I. Molecular transplantation: delivery of membranous proteins onto live cells. *Anal Biochem.* 340(1):184-186:2005
3. Yudoh K, Nakamura H, Masuko-Hongo K, Kato I, 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.* 7(4):R904-914:2005
4. Shibakawa A, Yudoh K, Masuko-Hongo K, Kato I, Nishioka K, Nakamura H. The role of subchondral bone resorption pits in osteoarthritis: MMP production by cells derived from bone marrow. *Osteoarthritis Cartilage.* 13(8):679-687:2005
5. Du H, Masuko-Hongo K, Nakamura H, Xiang Y, Bao CD, Wang XD, Chen SL, Nishioka K, Kato I. 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.* 26(1):35-41:2005
6. Tanaka M, Masuko-Hongo K, Kato I, Nishioka K, Nakamura H. Suppressive

- effects of hyaluronan on MMP-1 and RANTES production from chondrocytes. *Rheumatol Int.* 26(3): 185-190:2006
7. Tanaka Y, Nakamura M, Matsui T, Iizuka N, Kondo H, Tohma S, Masuko K, Yudoh K, Nakamura H, Nishioka K, Koizuka I, Kato I. Proteomic surveillance of autoantigens in relapsing polychondritis. *Microbiol Immunol.* 50(2): 117-126:2006
 8. Ishiyama M, Teramura M, Iwabe K, Kato I, Motoji T. Clonally expanded T-cells in the peripheral blood of patients with idiopathic Thrombocytopenic purpura and *Helicobacter pylori* infection. *Int J Hematol.* 83(2): 147-151:2006
 9. Xiang Y, Sekine T, Nakamura H, Imajoh-Ohmi S, Fukuda H, Yudoh K, Masuko-Hongo K, Nishioka K, Kato I. Fibulin-4 is a target of autoimmunity predominantly in patients with osteoarthritis. *J Immunol.* 176(5):3196-3204:2006
 10. Dai SM, Shan ZZ, Nakamura H, Masuko-Hongo K, Kato I, Nishioka K, Yudoh K. Catabolic stress induces features of chondrocyte senescence through overexpression of caveolin 1: possible involvement of caveolin 1-induced down-regulation of articular chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 54(39): 818-831:2006
 11. Murata M, Yudoh K, Nakamura H, Kato I, Inoue K, Chiba J, Nishioka K, Masuko-Hongo K. Distinct signaling pathways are involved in hypoxia- and IL-1-induced VEGF expression in human articular chondrocytes. *J Orthop Res:* 24(7): 1544-1554:2006
 12. Nakamura H, Tanaka M, Masuko-Hongo K, Yudoh K, Kato I, Beppu M, Nishioka K. Enhanced production of MMP-1, MMP-3, MMP-13, and RANTES by interaction of chondrocytes with autologous T cells. *Rheumatol Int.* 26(11): 984-990:2006
 13. Takahashi H, Yotsuyanagi H, Yasuda K, Koibuchi T, Suzuki M, Kato I, Nakamura T, Iwamoto A, Nishioka K, Iino S, Koike K, Itoh F. Molecular epidemiology of hepatitis A virus in metropolitan areas in Japan. *J Gastroenterol.:* 41(10): 981-986:2006
 14. Xiang Y, Masuko-Hongo K, Sekine T, Nakamura H, Yudoh K, Nishioka K, Kato I. Expression of proteinase-activated receptors (PAR)-2 in articular chondrocytes is modulated by IL-1beta, TNF-alpha and TGF-beta. *Osteoarthritis Cartilage.:* 14(11): 1163-1173:2006
 15. Kosuke Matsuo, Yang Xiang, Hiroshi Nakamura, Kayo Masuko, Kazuo Yudoh, Koji Noyori, Kusuki Nishioka, Tomoyuki Saito, Tomohiro Kato. Identification of novel citrullinated autoantigens of synovium in rheumatoid arthritis using a proteomic approach. *Arthritis Research & Therapy:* 8(6): R175:2006
 16. Nakamura, H. K. Masuko, K. Yudoh, T. Kato, T. Kamada and T. Kawahara. Effects of glucosamine administration on patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.:* 27(3): 213-218:2007
 17. Shimada S, Nakamura M, Tanaka Y, Tsutsumi K, Katano M, Masuko K, Yudoh K, Koizuka I, Kato I. Crosslinking of the CD69 molecule enhances S100A9 production in activated neutrophils. *Microbiol Immunol.:* 51(1): 87-98:2007
 18. Nakamura, H. K. Masuko, K. Yudoh, T. Kato, I, Kamada and T. Kawahara. Effects of celecoxib on human chondrocytes-enhanced production of chemokines. *Rheumatol Int:* 25(1):11-16:2007
 19. Masuko, K. M. Murata, H. Nakamura, K. Yudoh, K. Nishioka and I. Kato. Sphingosine-1-phosphate attenuates proteoglycan aggrecan expression via production of prostaglandin E2 from human articular chondrocytes. *BMC Musculoskelet Disord:* 8:29:2007
 20. Okunuki, Y. Y. Usui, M. Takeuchi, T. Kezuka, T. Hattori, K. Masuko, H. Nakamura, K. Yudoh, M. Usui, K. Nishioka, and I. Kato. Proteomic surveillance of autoimmunity in Behcet's disease with uveitis: Selenium binding protein is a novel autoantigen in Behcet's disease. *Exp Eye Res:* 84(5): 823-831: 2007
 21. Xiang Y, Matsui T, Matsuo K, Shimada K, Tohma S, Nakamura H, Masuko K, Yudoh K, Nishioka K, Kato I. Comprehensive investigation of disease-specific

- short peptides in sera from patients with systemic sclerosis: Complement C3f-des-arginine, detected predominantly in systemic sclerosis sera, enhances proliferation of vascular endothelial cells. *Arthritis Rheum.* : 56(6): 2018-2030:2007
22. Nakamura, H. K. Masuko, K. Yudoh, I. Kato, K. Nishioka, T. Sugihara and M. Beppu. Positron emission tomography with (18)F-FDG in osteoarthritic knee. *Osteoarthritis Cartilage*: 15(6): 673-681:2007
23. Yudoh K., Shishido K., Murayama H., Yano M., Matsubayashi K., Takada H., Nakamura H., Masuko K., Kato I. Water-soluble fullerene (C60) prevents degeneration of articular cartilage in osteoarthritis (OA): C60 downregulates catabolic activity of chondrocytes and inhibits degeneration of articular cartilage during the development of OA. *Arthritis Rheum.* : 56(10): 3307-3318:2007
24. Yamakawa K, Yoshida K, Nishikawa H, Kato I, Iwamoto T. Comparative analysis of interindividual variations in the seminal plasma proteome of fertile men with identification of potential markers for azoospermia in infertile patien. *J Andrology*: 28(6): 858-865:2007
25. Masuko K, Murata M, Xiang Y, Nakamura H, Yudoh K, Nishioka K, Beppu M, Kato I. Tryptase enhances release of vascular endothelial growth factor from human osteoarthritic chondrocytes. *Clin Exp Rheumatol.*: 25(6):860-865:2007
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし。
1. 実用新案登録
なし。

マウス CAWS 誘発冠動脈炎の発生における VEGF-A、TNF α の病理学的意義に関する研究

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、川崎病類似冠動脈病変を呈する *Candida albicans* 菌体外多糖画分(CAWS)誘発冠動脈炎の発生における、VEGF-A、TNF α の役割について病理学的検討を行った。CAWS 誘発冠動脈炎モデルに対し、抗 VEGF-A 抗体および抗 TNF α 抗体を投与することにより、冠動脈炎および起始部大動脈炎の改善を認めたことから、VEGF-A および TNF α が CAWS 誘発冠動脈炎の発生に大きく関与していることが明らかとなった。

A. 研究目的

Candida albicans 菌体外多糖画分（以下 CAWS）をマウスの腹腔内投与することにより、川崎病類似の冠動脈炎が惹起される。ヒト川崎病患者の血中 VEGF-A 濃度の上昇は多数報告されており、川崎病の病態に大きく関わっていると考えられている。また、難治性川崎病症例に対し、抗 TNF α 抗体投与が行われ改善した症例が報告されている。本研究では、CAWS 誘発冠動脈炎モデルマウスに対し抗 VEGF-A 抗体および抗 TNF α 抗体投与による冠動脈炎の発症抑制効果について病理学的検討を行い、本モデルにおける冠動脈炎の発生における VEGF-A、TNF α の病理学的意義について検討した。

B. 研究方法

C57B6/L(5week)に CAWS 4mg/day、5 日間腹腔内投与を行い、投与後 5 週目に病理学的評価を行った。抗 VEGF-A 抗体あるいは抗 TNF α 抗体を腹腔内投与および浸透圧ポンプを用い、CAWS 投与終了後から 1 週間かけて計 300 μ g の持続投与を行った。病理学的評価は大動脈弁レベルの冠動脈および起始部大動脈の炎症細胞浸潤および弾性線維障害の程度、内膜肥厚の有無ないし程度をスコアリングした。

（倫理面への配慮）

本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

CAWS 投与にて冠動脈ならびに起始部大動脈に高度な肉芽腫性汎動脈炎を生じた(n=7)。

抗 VEGF-A 抗体投与群(n=7)および抗 TNF α 抗体投与群(n=7)は無投与群(n=8)と比べて有意に炎症細胞浸潤、弾性線維障害の軽減を認めた(各 p=0.002、p=0.018)。また抗 VEGF-A 抗体投与群と比べて抗 TNF α 抗体投与群は有意に所見の改善を認めた(p=0.025)。

D. 考察 E. 結論

抗 VEGF-A 抗体および抗 TNF α 抗体投与、特に抗 TNF α 抗体投与は、CAWS 誘発冠動脈炎の発生抑制効果があり、VEGF-A、TNF α が冠動脈炎発生に関わっていることが示唆された。また抗 VEGF-A 抗体、抗 TNF α 抗体投与が川崎病の新たな治療法として期待される。然し乍ら、ヒト川崎病と同様に CAWS 誘発川崎病マウスモデルにおいても血管炎発生部と催炎因子作用部位には時間的・空間的に乖離があることから、これら抗体の投与時期については更なる検討が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表（2007 年度）

1. Kubo M, Hata J, Ninomiya T, Matsuda K, Yonemoto K, Nakano T, Matsushita T, Yamazaki K, Ohnishi Y, Saito S, Kitazono T, Ibayashi S, Sueishi K, Iida M, Nakamura Y, Kiyohara Y: A nonsynonymous SNP in *PRKCH* (protein kinase C η) increases the risk of cerebral infarction. *Nature Genetics* 39(2): 212-217, 2007
2. Nakashima Y, Fujii H, Sumiyoshi S, Wight TN, Sueishi K: Early human atherosclerosis: Accumulation of lipid

- and proteoglycans in intimal thickening followed by macrophage infiltration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27(5): 1159-1165, 2007
3. Fujii T, Sumiyoshi S, Koga T, Nishizaka M, Matsukawa R, Kuwano H, Sueishi K: An autopsy case report of annuloaortic ectasia with cardiac tamponade ruptured from an aneurysm of the right Valsalva sinus. *Pathol Res Pract* 203: 671-675, 2007
 4. Tanaka S, Yonemitsu Y, Yoshida K, Okano S, Kondo H, Inoue M, Hasegawa M, Masumoto K, Suita S, Taguchi T, Sueishi K: Impact of deletion of envelope-related genes of recombinant Sendai viruses on immune responses following pulmonary gene transfer of neonatal mice. *Gene Ther* 14: 1017-1028, 2007
 5. Yoneyama Y, Ueda Y, Akutsu Y, Matunaga A, Shimada H, Kato T, Kubota-Akizawa M, Okano S, Shibata S, Sueishi K, Hasegawa M, Ochiai T, Yonemitsu Y: Development of immunostimulatory virotherapy using non-transmissible Sendai virus - activated dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 355(1): 129-135, 2007
 6. M, Hasegawa M, Sueishi K: *In vivo* repopulation of cytoplasmically gene transferred hematopoietic cells by temperature-sensitive mutant of recombinant Sendai viral vector. *Biochem Biophys Res Commun* 361: 811-816, 2007
 7. Ninomiya T, Kubo M, Doi Y, Yomemoto K, Tanizaki Y, Tsuruya K, Sueishi K, Tsuneyoshi M, Iida M, Kiyohara Y: Prehypertension increases the risk for renal arteriosclerosis in autopsies: The Hisayama Study. *J Am Soc Nephrol* 18: 2135-2142, 2007
2. 学会発表
 1. 居石克夫. 動脈硬化と血管新生. 第8回 Pharmaco-Hematology シンポジウム. 2007年6月7日~8日 金沢
 2. Fujii T, Yonemitsu Y, Onimaru M, Sueishi K. VEGF function for upregulation of endogenous PLGF expression during FGF-2-mediated therapeutic angiogenesis. XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 2007年7月6日~12日 Geneva, Switzerland
 3. Onimaru M, Yonemitsu Y, Fujii T, Sueishi K. Role of angiopoietin(ANG)-1/Tie-2 signaling pathway for ANG-2 expression in vascular endothelial cells. XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 2007年7月6日~12日 Geneva, Switzerland
 4. 中島豊、住吉真治、トーマス ワイト、居石克夫. ヒト早期粥状硬化の発生: 肥厚内膜におけるプロテオグリカンとリポ蛋白の局在の関連、ならびにマクロファージの浸潤の機序に関する免疫組織化学的検討. 第39回日本動脈硬化学会総会・学術集会 2007年7月13日~14日 大阪
 5. 住吉真治、中島豊、土井康文、清原裕、飯田三雄、居石克夫. 久山町健診剖検例における冠状動脈動脈硬化の病理組織学的研究: 糖尿病および高血圧の病態学的意義. 第39回日本動脈硬化学会総会・学術集会 2007年7月13日~14日 大阪
 6. 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 α 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検討. 第48回日本脈管学会総会 2007年10月25日~27日 松本
 7. 鬼丸満穂、居石克夫. Tie-2 の可溶型変換機構とそれに伴う Tie-2 関連シグナル修飾に関する分子病理学的検討. 第48回日本脈管学会総会 2007年10月25日~27日 松本
 8. 竹下正文、古賀孝臣、高祖英典、吉野一郎、中西洋一、前原喜彦、居石克夫. 非小細胞肺癌における細胞周期制御分子 Aurora-A, B 及び Chfr 発現の臨床病理学的検討. 第48回日本肺癌学会総会. 2007

年 11 月 8 日～9 日 名古屋

9. 鬼丸満穂、居石克夫. Tie-2 の可溶型変換機構とそれに伴う Tie-2 関連シグナル修飾に関する分子病理学的検討. 第 30 回日本血栓止血学会学術集会 2007 年 11 月 15 日～17 日 志摩
10. Okano S, Kondo H, Sueishi K. A pivotal role of CD4 T-cells (CD4) for generation of functionally distinct memory CD8 T-cells (mCD8) in tumor immunotherapy (TI) using dendritic cells (DC) 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会 2007 年 11 月 20 日～22 日 東京
12. 近藤晴彦、岡野慎士、居石克夫. Fas 欠損樹状細胞を用いた抗腫瘍効果の検討. 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会 2007 年 11 月 20 日～22 日 東京
13. 鬼丸満穂、居石克夫. Tie-2 の可溶型変換機構とそれに伴う Tie-2 関連シグナル修飾に関する分子病理学的検討. 第 15 回日本血管生物医学会学術大会 2007 年 11 月 29 日～30 日 福岡

G. 知的財産権の出願・登録状況
特記事項なし

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

MPO-ANCA のリスクエピトープ—血管炎マウスの解析から

分担研究者 鈴木和男 千葉大学大学院医学研究院 教授

研究協力者：高橋 啓（東邦大学医療センター大橋病院・病理）

協力者：大野尚仁（東京薬科大学・薬学部）

長尾朋和（千葉大学大学院医学研究院）

富澤一夫（国立感染症研究所）

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、その病態には、MPO-ANCA のリスクエピトープが関与していることをすでに報告した(J Clin. Immunol. 1998, Clin. Nephrology, 2000, Microbiol. Immunol. 2007)。本年度は、急速進行性糸球体腎炎(RPGN)を自然発症する血管炎モデル動物である SCG/Kj マウスでの病態に関連した MPO-ANCA のリスクエピトープを解析した。RPGN の病態に連動して血清中 MPO-ANCA 値が変動し、MPO fragments の H 鎖中央部 (H-6) に反応する MPO-ANCA のリスクエピトープが、RPGN の病態と相関した。その IgG subclass は IgG2b であった。一方、SCG/Kj マウス血清でのサイトカインレベルは、IL-12p40, IL-13 (Th2 type cytokine) が高値で、IL-12p70 の変動は弱かった。これらの結果から、SCG/Kj マウスの MPO-ANCA に関連した病態には、MPO-ANCA のリスクエピトープ H-6 (IgG2b subclass, Th2 type IgG) が主に関与し、Th2 type cytokine 濃度が高値へシフトすることによって示唆された。

A. 緒言

血管炎の発症の要因には、活性化した好中球が関与していると推定され(Clinical Nephrology 40, 256-264, 1993, Nephrol., Dial. Transplant. 9:1708-1715, 2004)、好中球抗体 MPO-ANCA の抗原である Myeloperoxidase (MPO)、補体やその他の活性化分子が好中球活性が深く関与している(Exp. Mol. Pathol. 2007)。また、好中球の活性化に伴って好中球表面に表出する MPO に加え CD69 のかわりも重要であることを示してきた。一方、昨年度報告したように、MPO 抗体が直接血管炎誘導初期の血管内皮細胞傷害度に関わることを示した。

本年度は、MPO-ANCA 関連血管炎のモデル動物である SCG/Kj マウスが急速進行性糸球体腎炎(RPGN)を自然発症することから、本マウスを用いて MPO-ANCA のリスクエピ

トープと病態との関連を解析した。

B. 研究方法

1. SCG/Kj マウス (9-10 週令、雌) の血清中 MPO-ANCA 値および、マウス MPO 全長およびヒト MPO H 鎖部分の deletion fragments への相対的な反応の強さにより risk epitopes を測定した。(図 1)

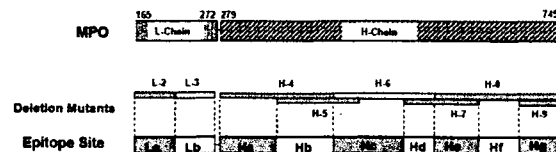


図 1. エピトープマップ

2. サイトカイン定量：

MPO-ANCA による内皮細胞障害に関与するサイトカインを 15 μ の血漿を用いて Bio-Plex により同時定量した。

(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

1. 急速進行性糸球体腎炎自然発症 SCG/Kj マウスの MPO-ANCA とその risk epitope の動態：

MPO-ANCA 関連血管炎のモデル動物である SCG/Kj マウスは、急速進行性糸球体腎炎(RPGN)を自然発症し、腎糸球体への好中球浸潤が顕著であった (図 2)。

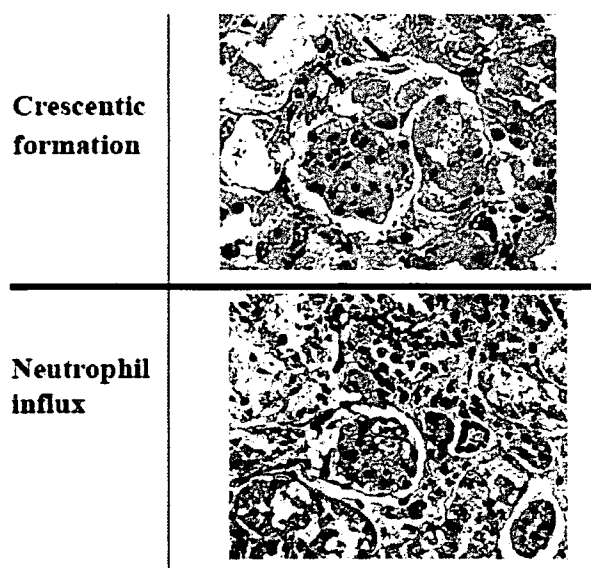


図 2. SCG/Kj マウスの腎糸球体半月体形成と好中球浸潤

それに伴って蛋白尿が増加した (図 3)。

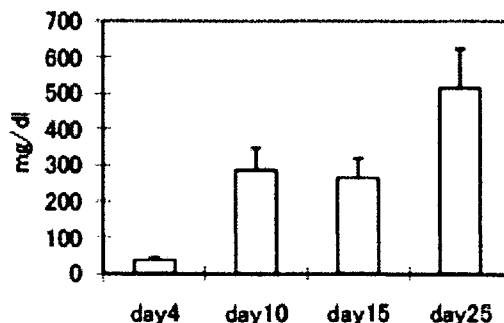


図 3. SCG/Kj マウスの蛋白尿の経時的変動 10 w 齢以後の観察

それにつれ、血中の MPO-ANCA も高値を示し、その病態と MPO-ANCA のリスクエピトープとの関連を解析した。その結果、SCG/Kj マウスの RPGN の病態に連動して血清中 MPO-ANCA 値が変動した。また、MPO-ANCA のリスクエピトープは、MPO fragments の H 鎖中央部 (H-6) に対応する部分と強く反応することを確認した (図 4)。

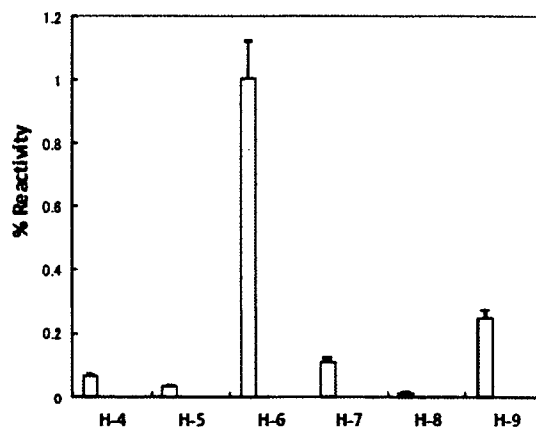


図 4. SCG/Kj マウスの MPO-ANCA のリスクエピトープ

このリスクエピトープである H-6 は、RPGN の病態と相関し、さらに、H-6 に反応する MPO-ANCA の IgG subclass は IgG2b を示した (図 5)。

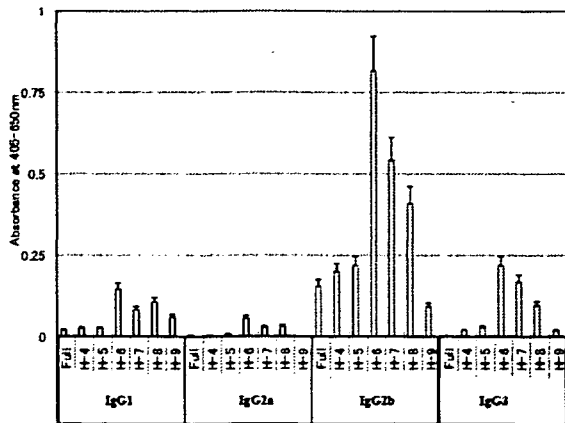


図5. リスクエピトープのMPO-ANCAは、IgG2b。

一方、SCG/Kj マウス血清でのサイトカインレベルは、IL-12p40, IL-13 (Th2 type cytokine) が高値を示し、IL-12p70 の変動は弱かった。

D. 考察

急速進行性糸球体腎炎の炎症初期に起こる血管傷害に機構におけるMPO-ANCAの役割を明らかにするため、MPO-ANCA関連血管炎患者において、MPO-ANCAおよびCRP、白血球の上昇に加え、その病態には、MPO-ANCAのリスクエピトープが関与していることをすでに報告した(J Clin. Immunol. 1998, Clin. Nephrology, 2000, Microbiol. Immunol. 2007)。本研究では、モデルマウスとして、SCG/Kj マウスを用いて、その病態に関連したMPO-ANCAのリスクエピトープを解析した。その結果、MPO-ANCAは、好中球への作用に加え、リスクエピトープが関与していることが判明した。

SCG/Kj マウスの病態に関連したMPO-ANCAは、IgG2b subclassであるH-6 (Th2 type IgG) が病態に主に関与することと、Th2 type cytokine 濃度が高値へシフトすることによっていることが示唆された。

尚、本研究は、発表者のほか、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。

E. 結論

本年度は、RPGNを自然発症する血管炎モデル動物であるSCG/Kj マウスでの病態に

関連したMPO-ANCAのリスクエピトープを解析した。病態に連動し、血清中MPO-ANCA値が変動し、MPO fragmentsのH鎖中央部(H-6)に反応するMPO-ANCAのリスクエピトープが、RPGNの病態と関連した。そのIgG subclassはIgG2bであった。一方、SCG/Kj マウス血清でのサイトカインレベルは、IL-12p40, IL-13が高値であったが、IL-12p70の変動は弱かった。これらの結果から、SCG/Kj マウスのMPO-ANCAに関連した病態には、MPO-ANCAのリスクエピトープH-6 (IgG2b subclass, Th2 type IgG) が主に関与し、Th2 type cytokine 濃度が高値へシフトすることによっていることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

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- β -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巻 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. Immomodulatory effect of intravenous immunoglobulin (IVIg) therapy in MPO-ANCA related polyangiitis with RPGN by amelioration of impaired IFN α 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- α 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- α 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- α 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 α 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

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

ANCA 関連血管炎関連遺伝子に関する研究

分担研究者 土屋 尚之 筑波大学大学院人間総合科学研究科 教授

協力者 川崎 綾、伊東 郁恵、古賀 農人

筑波大学大学院人間総合科学研究科

有波忠雄 筑波大学大学院人間総合科学研究科 教授

研究要旨

前年度までの研究により、感染抵抗性に関与する遺伝子多型が ANCA 関連血管炎の発症に関与するとの仮説をたて、本年度は、ウイルス感染抵抗性に寄与し、種々のリウマチ性疾患との関連が最近注目されている、I 型インターフェロンパスウェイ遺伝子群と日本人 ANCA 関連血管炎との関連解析を施行したところ、*IRF5* 近傍に位置する rs2280714 と ANCA 関連血管炎の関連が検出された。この関連は、顕微鏡的多発血管炎よりも、Wegener 肉芽腫症や Churg-Strauss 症候群において顕著な傾向が認められた。データベースを用いた発現解析により、この SNP は、*IRF5* mRNA 発現量に関連することが示唆された。

A. 研究目的

われわれは、前年度までに、日本人顕微鏡的多発血管炎 (MPA) と *HLA-DRB1*0901-DQB1*0303* ハプロタイプ、killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR)多型と HLA-class I との組み合わせ、leukocyte immunoglobulin-like receptor A2 (*LILRA2*, *ILT1*, *LIR7*)スプライス部位多型との関連を報告してきた。

これらの知見に基づき、ウイルスをはじめとする病原微生物に対する免疫応答の個体差が疾患感受性に寄与する可能性を考え、type I interferon (IFN)パスウェイ遺伝子群に注目した。

Interferon regulatory factor 5 (*IRF5*)は、type I IFN や炎症性サイトカインの誘導に寄与する転写因子であり、近年、全身性エリテマトーデス (SLE)、関節リウマチ (RA)、Sjögren 症候群などで疾患感受性との関連が次々に報告されている。われわれは、日本人 SLE における *IRF5* の関連研究を施行し、日本人集団においても *IRF5* と SLE との関連は認められるものの、ハプロタイプ構成はヨーロッパ系集団と異なり、ヨーロッパ系集団には存在しない SNP により規定される SLE 抵抗性ハプロタイプが存在することを見いだした (Kawasaki et al., *Arthritis Rheum* in press)。

本年の研究では、上記の研究よりわれわれが決定した日本人集団における *IRF5* ハプロタイプに基づいて決定した tagSNP を利用して、ANCA 関連血管炎との関連を検討した。

また、Golden Gate Assay (Illumina)を利用して、type I IFN パスウェイ遺伝子より、日本人集団における連鎖不平衡、アリル頻度に基づいて選定した 55 遺伝子の 384 SNP について、ANCA 関連血管炎との関連を検討した。

B. 研究方法

日本人健常者集団における解析から、連鎖不平衡を考慮の上選定した *IRF5* の tag SNP rs729302, rs6953165, rs2004640, rs41298401, rs3807306, rs10954213, rs22807148 (図 1) について、ANCA 関連血管炎 75 例 (MPA 49, Wegener 肉芽腫症 (WG) 8, Churg-Strauss 症候群 (CSS) 9, その他 9) および健常対照者 201 例について、関連解析を施行した。

また、Golden Gate システム (Illumina) を用い、日本人における連鎖不平衡とアリル頻度に基づいて選択された、type I IFN パスウェイ 55 遺伝子の 384 SNP 解析用のマイクロアレイを作製し、関連解析を施行した。

(倫理面への配慮)

本研究では、平成 11~13 年度の研究班において多施設共同研究により収集され、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、筑波大学大学院人間総合科学研究科 医の倫理委員会において得た上で施行した。

C. 研究結果

IRF5 の tag SNP と ANCA 関連血管炎の関連研究の結果、*IRF5* の約 5 kb 下流に位置する SNP rs2280714 において、ANCA 関連血管炎における G/G 遺伝子型の有意な減少が検出された ($P=0.049$, $OR=0.49$ (0.24-1.01)) (表 1, 図 1)。この傾向は、MPA 群では弱くなるのに対し、WG, CSS 群でより強い傾向が認められた (表 1)。他の SNP では、有意な関連は検出されなかった。

IRF5 rs2280714 の *IRF5* 発現に対する影響を、HapMap サンプル (JPT, CHB) 由来の B 細胞株における mRNA 発現プロファイル データベース (GENEVAR, <http://www.sanger.ac.uk/humgen/genevar/>) を用いて解析したところ、ANCA 関連血管炎に対して抵抗性である G/G 遺伝子型では、*IRF5* mRNA レベルが有意に低いことが明らかになった (図 2)。

また、カスタムアレイを用いた type I IFN パスウェイ遺伝子群 384 SNP の関連解析について、遺伝子型のデータの取得が完了した。

D. 考察

IRF5 発現量の低下と関連する SNP が ANCA 関連血管炎に対する抵抗性と関連することが示された。これは、ANCA 関

連血管炎の発症に *IRF5* が関与することを示唆する知見と考えられる。

最近、米国において、*IRF5* イントロン 1 多型 (rs3807306) と WG との関連が発表された (Ederberg et al., American College of Rheumatology 2007) ことと考え合わせると、*IRF5* が集団を超えた ANCA 関連血管炎の疾患感受性遺伝子である可能性が示唆される。

rs2280714 と *IRF5* 発現との関連は、ヨーロッパ系集団における解析から示されているが (Graham et al., Nat Genet 2006 ほか)、ハプロタイプ構成の異なるアジア系集団においても関連が存在することが示唆された。

カスタムアレイを用いた type I IFN パスウェイ遺伝子群の関連解析については、本年度取得された遺伝子型データを用いて、今後、関連解析を施行し、見いだされた候補遺伝子について、高密度マッピングを施行し、新たな疾患関連遺伝子を同定する計画である。

E. 結論

IRF5 近傍に位置し、*IRF5* 発現と関連する SNP が、ANCA 関連血管炎の疾患感受性と関連する可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kawasaki A, Tsuchiya N, Ohashi J, Murakami Y, Fukazawa T, Kusaoi M, Matsuta K, Hashimoto H, Tokunaga K. Role of *APRIL* (*TNFSF13*) polymorphisms in the susceptibility to systemic lupus erythematosus in Japanese. *Rheumatology* 46: 776-782, 2007.

2. Hitomi Y, Tsuchiya N, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K, Tokunaga K, Sato S. Association of human *CD22* gene polymorphism with susceptibility to limited cutaneous systemic sclerosis. *Tissue Antigens* 69:242-249, 2007.

3. Furuya T, Hakoda M, Ichikawa N, Higami K, Nanke Y, Yago T, Kobashigawa T, Tokunaga K, Tsuchiya N, Kamatani N,

Kotake S. Differential association of HLA-DRB1 alleles in Japanese patients with early rheumatoid arthritis in relationship to autoantibodies to cyclic citrullinated peptide. *Clin Exp Rheumatol* 25:219-224, 2007.

4. Tsuchiya N, Kyogoku C, Miyashita R, Kuroki K: Diversity of human immune system multigene families and its implication in the genetic background of rheumatic diseases. *Curr Med Chem* 14:421-439, 2007.

5. Kyogoku C, Tsuchiya N. A compass that points to lupus: Genetic studies on type I interferon pathway. *Genes Immun* 8:445-455, 2007.

6. Kawasaki A, Kyogoku C, Ohashi J, Miyashita R, Hikami K, Kusaoi M, Tokunaga K, Takasaki Y, Hashimoto H, Behrens TW, Tsuchiya N. Association of interferon regulatory factor 5 (IRF5) polymorphisms with systemic lupus erythematosus in Japanese: Support for a crucial role of intron 1 polymorphisms. *Arthritis Rheum* (in press)

7. Mamegano K, Kuroki K, Miyashita R, Matsuta K, Maenaka K, Colonna M, Ozaki S, Hashimoto H, Takasaki Y, Tokunaga K, Tsuchiya N. Association of *LILRA2* (*IL1I1*, *LIR7*) splice site polymorphism with systemic lupus erythematosus and microscopic polyangiitis. *Genes Immun* (in press)

8. 土屋尚之. 全身性エリテマトーデス-疾患感受性遺伝子探索の最近の進歩-. *リウマチ科* 37:203-208, 2007.

9. 京極千恵子, 土屋尚之. 全身性エリテマトーデスにおけるIRF5多型の意義. *医学のあゆみ* 222:214-216, 2007.

10. 土屋尚之. 関節リウマチ関連遺伝子解析に基づく新規治療法開発の可能性. *BIO Clinica* 22:894-897, 2007.

11. 土屋尚之, 京極千恵子. SLE発症の分子機序-ゲノム解析による最新の知見. *リウマチ科* 38:103-108, 2007.

12. 櫻井大祐, 川崎綾, 小端哲二, 土屋尚之. BAFF, APRILの機能と自己免疫疾患における役割. *分子リウマチ* 4:307-313, 2007.

13. 土屋尚之: 強直性脊椎炎の発症にか

かわる遺伝因子. *リウマチ科* 38:409-415, 2007.

2. 学会発表

1. 土屋尚之, 川崎綾, 京極千恵子. 全身性エリテマトーデスにおける interferon regulatory factor 5 (IRF5)多型の関連(シンポジウム). 2007年日本リウマチ学会総会、2007年4月26~29日、横浜(抄録集 p190)。

2. 江原幸和, 土屋尚之, 松下正毅, 長谷川稔, 藤本学, 徳永勝士, 竹原和彦, 佐藤伸一: 広汎性皮膚硬化型強皮症とIL-10受容体β鎖多型との関連. 2007年日本リウマチ学会総会、2007年4月26~29日、横浜(抄録集 p369)。

3. 川崎綾, 草生真規雄, 深沢徹, 橋本博史, 高崎芳成, 徳永勝士, 土屋尚之: 日本人集団における interferon regulatory factor 5(IRF5)遺伝子多型と全身性エリテマトーデスの関連. 2007年日本リウマチ学会総会、2007年4月26~29日、横浜(抄録集 p467)。

4. Tsuchiya N, Kuroki K, Hitomi Y, Hasegawa M, Fujimoto M, Tokunaga K, Tedder TF, Takehara K, Sato S. Role of CD19 and CD22 polymorphisms in the susceptibility to human systemic sclerosis. Professor E. Carwile LeRoy Memorial International Workshop on Scleroderma, May 18-20, 2007, Tokyo.

5. Ehara Y, Matsushita M, Hasegawa M, Fujimoto M, Miyagi T, Kashiwase K, Oka T, Satake M, Tokunaga K, Takehara K, Sato S, Tsuchiya N. Association of IL10 promoter polymorphism with total skin score in systemic sclerosis. Professor E. Carwile LeRoy Memorial International Workshop on Scleroderma, May 18-20, 2007, Tokyo.

6. 土屋尚之, 川崎綾, 宮下リサ, 大橋順, 徳永勝士, 草生真規雄, 高崎芳成, 橋本博史, Timothy W. Behrens, 京極千恵子: 日本人における全身性エリテマトーデスと interferon regulatory factor 5 (IRF5)との関連. 日本人類遺伝学会第52回大会 2007年9月12~15日、東京。(抄録集 p171)。

7. 江原幸和、松下正毅、長谷川稔、藤本学、宮城徹、柏瀬貢一、岡孝紀、佐竹正博、徳永勝士、竹原和彦、佐藤伸一、土屋尚之：広汎性皮膚硬化型強皮症と IL-10 受容体・鎖多型との関連。日本人類遺伝学会第 52 回大会 2007 年 9 月 12～15 日、東京。(抄録集 p106)。

8. 古谷武文、箱田雅之、土屋尚之、松本功、市川奈緒美、南家由紀、八子徹、小橋川剛、住田孝之、鎌谷直之、小竹茂：早期 RA 患者における抗 CCP 抗体および抗 GPI 抗体と HLA-DRB1 遺伝子型との関連。日本人類遺伝学会第 52 回大会 2007 年 9 月 12～15 日、東京。(抄録集 p161)。

9. 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(MPA)の疾患感受性と KIR-HLA 遺伝子多型。第 16 回日本組織適合性学会、2007 年 9 月 12 日 京都

10. Kawasaki A, Kyogoku C, Miyashita R, Ohashi J, Tokunaga K, Kusaoi M, Takasaki Y, Hashimoto H, Behrens TW, Tsuchiya N. A SNP in IRF5 intron 1 defines a protective haplotype against SLE in Japanese. 2007 American College of Rheumatology Annual scientific Meeting, Boston, November 6-11, Boston.

11. Tsuchiya N, Kawasaki A, Takasaki Y, Hashimoto H, Ohashi J. Total number of risk alleles in four susceptibility genes as a

marker for genetic risk to SLE. 2007 American College of Rheumatology Annual scientific Meeting, Boston, November 6-11, Boston.

12. Furuya T, Matsumoto I, Tsuchiya N, Hakoda M, Ichikawa N, Yago T, Nanke Y, Sumida T, Kamatani N, Kotake S. Anti-glucose-6-phosphate isomerase, anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and HLA-DRB1 genotypes in Japanese patients with early rheumatoid arthritis. 2007 American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting, Boston, November 6-11, Boston.

13. Hitomi Y, Adachi T, Tsuchiya N, Honda Z, Tokunaga K, Tsubata T. The alternative spliced isoform of human CD72 that confer resistant against systemic lupus erythematosus regulate B lymphocyte apoptosis. 2007 年日本免疫学会総会、東京、2007 年 11 月 20 日～22 日。

G. 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。

表 1 日本人 ANCA 関連血管炎と *IRF5* rs228714 の関連

	ANCA 関連血管炎全体(n=75)*		MPA (n=49)		WG (n= 8)		CSS (n= 9)		controls (n=201)	
G/G	11	(0.147)	9	(0.184)	1	(0.125)	1	(0.111)	52	(0.259)
A/G	41	(0.547)	27	(0.551)	4	(0.5)	4	(0.444)	89	(0.443)
A/A	23	(0.307)	13	(0.265)	3	(0.375)	4	(0.444)	60	(0.299)

ANCA 関連血管炎群において、G/G 遺伝子型頻度が、(A/G+G/G)と比較して、オッズ比オッズ比 0.49 (95%信頼区間 0.24-1.01)、 $P=0.049$ で減少していた。() 内に遺伝子型頻度を示す。

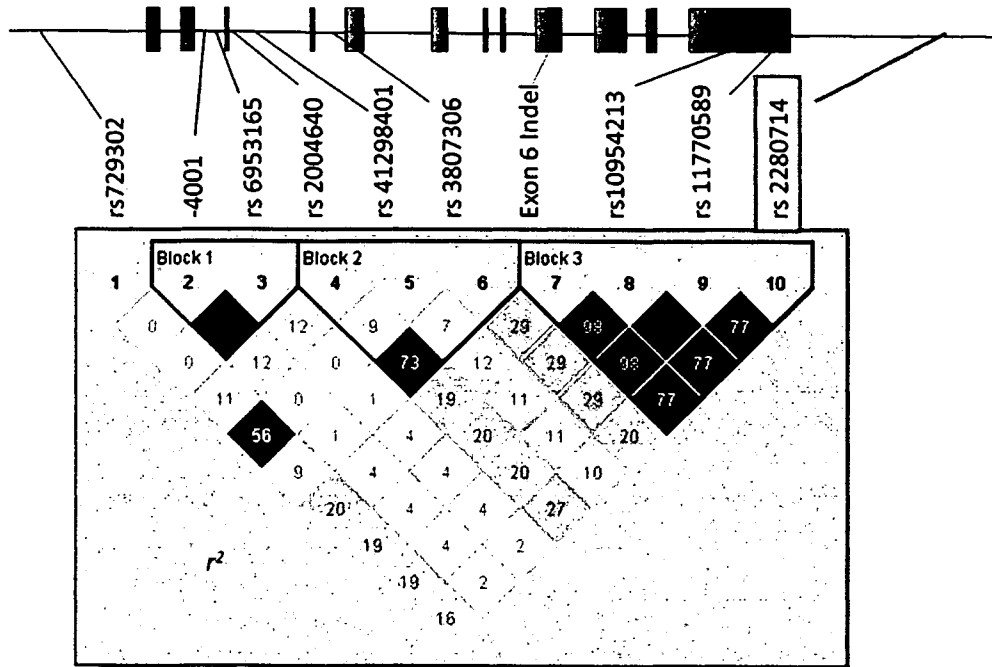


図 1 日本人 *IRF5* の連鎖不平衡プロット。関連が検出された rs2280714 は、*IRF5* 遺伝子の約 5kb 下流に位置する。

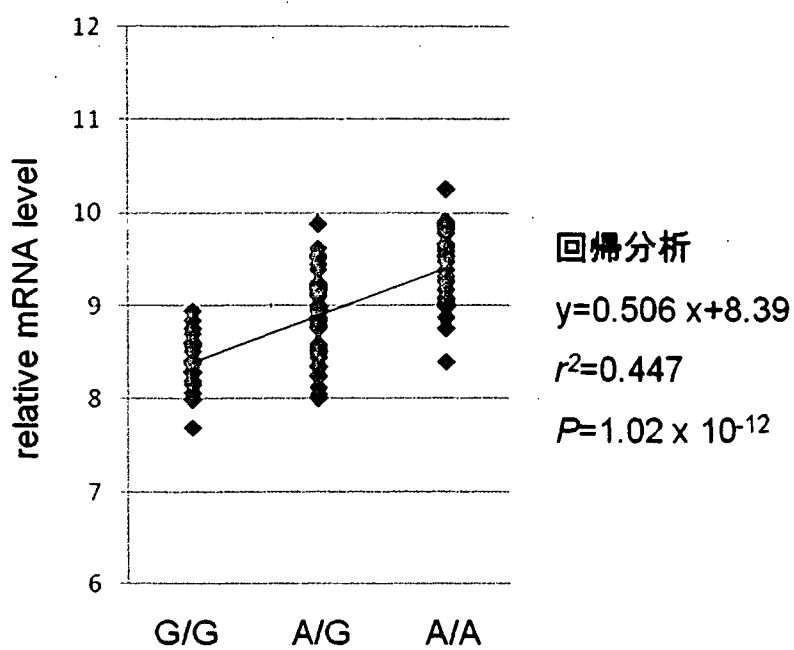


図2 HapMap JPT, CHB 検体(n=88)における rs2280714 遺伝子型と、B 細胞株における *IRF5* mRNA 発現量の関連。mRNA 発現量は、GENEVAR データベース (<http://www.sanger.ac.uk/humgen/genevar/>)より取得した。

無細胞タンパク質合成系による自己抗体のスクリーニング法と簡便な ELISA 法の確立

分担研究者 能勢真人 愛媛大学大学院医学系研究科 ゲノム病理学分野 教授

研究協力者 小森浩章、曾我美子（愛媛大学大学院医学系研究科 ゲノム病理学分野）

田中ゆき（愛媛大学統合科学研究支援センター）

澤崎達也、遠藤弥重太（愛媛大学無細胞科学生命工学研究センター）

研究要旨

昨年度に無細胞タンパク質合成系と AlphaScreen 法とを組合わせた新規自己抗体の探索法を確立した。この方法を用いて、これまでに我々が同定した膠原病関連感受性遺伝子座近傍の蛋白質から 120 個のビオチン融合タンパク質を合成し、血管炎モデルであるリコンビナントインブレッドマウス MXH/lpr と両親系統の計 17 系統の血清を対象とし解析した。その結果、合成タンパク質の半数以上に対して自己抗体の産生が観察された。その中には、血管炎関連自己抗体も含まれていた。今年度はこれらをより定量的に解析するため、この無細胞タンパク質合成系を利用し、GST タグをつけた融合タンパク質を合成し、これに対する自己抗体を簡便かつ迅速に定量する系として capture ELISA system を確立した。

A. 研究目的

自己免疫病では様々な自己抗体が産生され、そのうちいくつかは診断や治療効果判定などの目的で臨床応用されている。しかしこのような有用な自己抗体の数はまだ少なく、さらに、自己免疫病病態の理解に寄与する新規自己抗体の検索が必要とされている。今回我々は、多数のタンパク質を高効率に短期間に合成しうる小麦胚芽を利用した無細胞タンパク質合成系と自己免疫病関連組換え近交系マウスを用いた従来とは異なったアプローチによる新規自己抗体の探索法の確立を試みた。

B. 研究方法

自己免疫病関連組換え近交系 (RI 系)MXH/lpr マウスは多彩な自己抗体の産生や、腎炎や関節炎、血管炎など様々な自己免疫病を自然発症する自己免疫病好発系マウス MRL/lpr と嫌発系マウス C3H/lpr の雑種第 2 世代を出発点に、兄妹交配を 20 世代以上繰り返し作出された 15 系統の近交系からなるマウスの系統群で、遺伝学的性

質に基づき、系統ごとに様々な組合せの自己抗体、自己免疫病の出現が見られる。そしてこの病態の組合せは系統ごとに遺伝的に保存されているため、自己抗体価の推移と病態発症との関連を経時的に観察できる。

また、小麦胚芽を利用した無細胞タンパク質合成系は PCR base で Tag を融合させた合成タンパク質を大量に、容易に産生しうる。愛媛大学無細胞生命工学研究センターの澤崎先生のグループが開発したビオチン融合合成タンパク質と AlphaScreen 法を組み合わせて血清中の自己抗体を高感度、high-throughput に検出するシステムを用い、MXH/lpr および両親系統 計 17 系統について、感受性遺伝子座情報に基づき網羅的に合成した 120 個のビオチン融合合成タンパク質に対する血清中の自己抗体価を経時的に測定し、自己免疫病態との関連を検討した。

一方、AlphaScreen 法は定量性に問題が残されており、ELISA 法などによる測定結果の再現性の確認が必要である。その際、従来の合成タンパク質を使用する ELISA 法では、タンパク質の精製、固相化などに様々な

行程、条件設定が必要で、煩雑な操作を必要とし、多種類の抗原を用いた自己抗体の測定には問題がある。そこで、無細胞タンパク質合成系で作成した GST Tag 融合タンパク質を用いた capture ELISA system の確立を試みた。この方法では合成タンパク質を精製せずに crude な状態で ELISA の抗原に供することができる(図 1)。今年度は MXH/lpr および両親系統 計 17 系統を対象に、血清 IgG-RF および血清 IgM-RF について、抗原を従来の大腸菌を用いた recombinant Fc とする ELISA 法と、GST-Tag 融合合成タンパク質とする capture ELISA system により測定し結果を比較した(倫理面への配慮)

動物実験は愛媛大学動物実験指針に基づき倫理面に配慮して行った。

ヒトの検体を対象とする解析は行っていない。

C. 研究結果

a) AlphaScreen 法

合成された 120 個の融合タンパク質のうち、約半数に自己抗体の産生が認められた。血管炎病態でみると、複数のタンパク質について、病態と自己抗体価に統計学的に有意な相関が認められた(図 2)。

b) capture ELISA system

recombinant Fc を用いた ELISA 法と GST-Tag 融合合成タンパク質とリアクタントとする capture ELISA system により、MXH/lpr および両親系統の 17 系統を対象に血清 IgG-RF、血清 IgM-RF を測定したところ、両者でほぼ同様の測定結果が得られた(図 3)。

D. 考察

AlphaScreen 法による解析の結果、自己免疫病態では生体内で想像以上に多数の自己抗体が産生されていることが明らかになった。また自己抗体価の推移と病態との関連を観察し病態特異的な自己抗体を同定する上で、病態の観察を経時的に行うことができ、また環境要因を変動させる組換え近

交系の有用性が再確認された。今回確立した GST-Tag 融合合成タンパク質をリアクタントとした capture ELISA system は従来の ELISA 法と遜色のない測定結果が得られており、新規自己抗体を定量的に解析しうる有用な手法である。

E. 結論

無細胞タンパク質合成系を用いた AlphaScreen 法と、GST-Tag 融合合成タンパク質をリアクタントとした capture ELISA system を確立した。これらの手法を合わせることにより、high-throughput に自己抗体のスクリーニング、そして定量的検証が可能になると考えられる。

F. 研究発表

論文発表

1. Nose M.: A Proposal Concept of a Polygene Network in Systemic Vasculitis: Lessons from MRL Mouse Models. *Allergol Int.* 2007 56: 79-86, 2007.
2. 能勢真人、小森浩章、宮崎龍彦、澤崎達也、遠藤弥重太.: 【無細胞生命科学の創成】 膠原病のゲノム解析に基づく疾病関連タンパク質の探索 無細胞タンパク質合成系の応用. *生化学* 79: 287-295, 2007.
3. 能勢真人、小森浩章: 血管炎の機序-モデルマウスにおけるゲノムの仕組み-. *腎と透析* 63:23-30, 2007
4. Ono M, Nose M.: Persistent expression of an unproductive immunoglobulin heavy chain allele with D_H-J_H configuration in peripheral tissues. *APMIS.* 115: 1350-1356, 2007.
5. Oishi H, Mizuki S, Terada M, Kubo M, Araki K, Araki M, Nose M., Takahashi S.: Increased expression of soluble form of vascular cell adhesion molecule-1 aggravates autoimmune arthritis in MRL- Fas^{lpr} mice. *Pathology International.* 57:734-740, 2007.
6. Yoshimoto S, Nakatani K, Iwano M, Asai