

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 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者

鈴木 和 男

平成 21 (2009) 年 3 月

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 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者

鈴木 和 男

平成 21 (2009) 年 3 月

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）  
総括・分担研究報告

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

研究代表者：所属施設：千葉大学大学院医学研究院 教授  
氏 名：鈴木 和男

研究分担者

所属施設：国立感染症研究所 室長

氏 名：大島正道

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：新潟大学 教授

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：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：大阪大学 准教授

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：宮崎大学 准教授

氏 名：藤元昭一

所属施設：国立国際医療センター 部長

氏 名：河内正治

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：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)レイ・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：(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：東京大学医学部付属病院 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<br>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<br>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<br>亀岡洋祐、大島正道、鈴木和男      | 12  |
| 2)免疫グロブリンの In vitro での評価法の検討  |     |
| 2)-1 人工ガンマグロブリン開発のための in vitro 評価系の検討<br>大野尚仁                                   | 17  |
| 2)-2 免疫グロブリンの in vitro での評価法の検討—活性化血管内皮細胞への作用—<br>長尾朋和、鈴木和男、山本健二、河内正治           | 23  |
| 2)-3 In vitro 評価系の確立と MPO-ANCA 腎炎のサイトカイン・ケモカイン動態の特性<br>宇野賀津子                    | 31  |
| 2)-4 自己免疫疾患患者の血液細胞に特異的な遺伝子群の包括的単離と機能解析<br>野島 博                                  | 37  |
| 3)モデル動物によるヒト型免疫グロブリンの治療効果   |     |
| 3)-1 CAWS 誘発マウス血管炎モデルにおける TNF- $\alpha$ 阻害薬<br>高橋 啓                             | 41  |
| 3)-2 自己免疫性心筋炎の機序および融合蛋白治療の検討<br>相澤義房  | 44  |
| 3)-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<br>食細胞 NADPH-オキシダーゼ欠損による肺炎の誘発<br>荒谷康昭          | 47  |
| 2. 臨床班  |     |
| 1) 臨床・病理所見に関する特異性の検討と顕微鏡的多発血管炎における血中サイトカイン・ケモカインの IgA 腎症とのレベルの差異<br>武曾恵理        | 51  |
| 2) 急性期川崎病に対する超大量単回免疫グロブリン療法の酸化ストレス抑制効果<br>—特に carbon monoxide への影響について—<br>佐地 勉 | 57  |
| 3) 欧州・米国リウマチ学会の血管炎の基準改訂のための国際会議に参加して<br>小林茂人                                    | 60  |
| 4) 糸球体腎炎と無菌性心内膜炎を合併する PR3-ANCA 関連血管炎<br>今井圓裕                                    | 65  |
| 5) $\gamma$ グロブリン治療の適応となる血管炎症例 —感染症で難治な症例から考える—<br>湯村和子                         | 69  |
| 6) MPO-ANCA 関連血管炎の再燃時における大量 $\gamma$ グロブリン療法の効果について<br>山縣邦弘                     | 72  |
| 7) 抗好中球細胞質抗体 (ANCA) 関連腎血管炎の本邦・欧州間での臨床疫学調査に関する研究<br>藤元昭一、布井博幸                    | 76  |
| 8) 魚油による ANCA 関連血管炎治療法の開発<br>平橋淳一   | 81  |
| III. 公開シンポジウム、班会議資料   | 87  |
| IV. 研究成果の刊行に関する一覧表  | 100 |
| V. 研究成果の刊行物・別刷 (主要のみ)   | 107 |

## 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

研究代表者：鈴木和男 千葉大学大学院医学研究院 特任教授

**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。IVIgの適応拡大や需要の増加に加え、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の急務となっている。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、これまでにマウス型の完成とヒト型を構築した。本年度は、ヒト型の臨床応用化に向け、プロトタイプクローンの構成を検討し、*in vitro*での体外評価法の検討と治療法の検討も行った。具体的には、**1）ヒト型人工ガンマグロブリンの開発**、**2）モデルマウスによる力価判定**をした。**3）体外診断法の開発**を免疫系と血管内皮細胞にて検討した。そして、**4）臨床治験をみずえた臨床研究**：臨床応用の準備を開始し、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評価と治療法のバックアップをした。以上から、ヒト型人工免疫グロブリンの*in vitro*での評価法ができた。一方、IVIg治療の効果判定の有効性のパラメーターの選択は、欧州血管炎協会（EUVAS）でも採用され、**国際評価会議**に当班からも運営委員2名、オブザーバとして1名が参加して討論に加わった。今後に残った課題は、**1）生産系の確立**：大量調整法、精製の技術、**2）体外評価系の確立**、**3）作用機序の解明**である。今後も、本研究事業の成果を臨床に生かし、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。

### A. 研究目的

高度高齢社会に入ったわが国においては、年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、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）の必要性が増している。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、**1）ヒト型人工ガンマグロブリンの開発**：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抗体を作製する系で人工型を開発し、これを基にプロトタイプのヒト型を完成させることを目的とした。また、**2）力価判定モデルマウスの開発**：血管炎IVIg治療法の開発のためのモデルマウスおよび、致死性の劇症型心筋炎の疾患モデ

ルを作製、**3）モデルマウスによる力価判定**：上記モデルマウスを用い、力価を判定する。**4）体外診断法の開発**：ヒト型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*での体外評価法の開発をめざす。特に、anti-MPO抗体の糸球体血管内皮細胞への作用の利用、Bio-Plexによる多項目のサイトカイン・ケモカインの網羅的解析、免疫細胞の機能評価法を検討する。さらに、**5）臨床治験をみずえた臨床研究**：急性期川崎病およびそれと同じプロトコルによる、血管炎・腎炎の臨床研究の成果（Nephron Clin Pract. 102:c35-c42, 2005）を基にしたヒト型に特化した治療効果判定や臨床治験に向けた動物モデルでの治療評価を支援する。

本年度は、これらの目的にフォーカスを絞り、**1）ヒト型人工ガンマグロブリンの開発**：ヒト型の完成を目標として、発現ベクターライブラ

リーを検定する。2) モデルマウスによる力価判定、3) 体外診断法の開発：臨床応用に向けて、*in vitro*での体外診断法の開発を進める。そして、4) 臨床治験をみすえた臨床研究：臨床探索試験も含め臨床応用の準備を開始し、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評価と治療法のバックアップをする。

## B. 研究方法

詳細は、各分担報告を参照

### 1. 基礎分科会

#### 1) ヒト型人工免疫グロブリンのクローンの選択と安定性・安全性の評価

・改良型ライブラリーの任意のクローンと TNF $\alpha$ との結合活性

各クローンを少量培養(約 1ml)し菌体を収集し、還元状態(2メルカプトエタノール存在下)でイオン性界面活性剤を用いて超音波処理により細胞破砕し、菌体中の ScFv タンパクを可溶化した。SDS-PAGE により展開した後、PVDF膜に転写し固相化した ScFv にヒト TNF $\alpha$  を結合させ TNF $\alpha$  との結合は ScFv の結合活性を評価した。

#### 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た。*In vitro* 評価系では、ヒト末梢血リンパ球、単球、好中球および血管内皮細胞を用いて、評価系を検討した。

##### 2-1) 免疫細胞への作用：

a) IgG のプレートへの吸着量の測定、b) IVIg 希釈溶媒の検討

2-2) ヒト末梢血単核球(PBMC)の固相化 IVIg によるサイトカイン産生測定のための至適条件の検討。

2-3) Bio-Plex を用いた PBMC からのサイトカイン・ケモカインの網羅的解析

2-2) 全血法によるサイトカイン産生能の検討：

2-3) 単球の抗原提示能に対する IVIg の影響：

CD4<sup>-</sup> MicroBeads にて分離した CD4<sup>+</sup>T 細胞(2x10<sup>5</sup>/200  $\mu$ l/well)、抗 CD3 抗体(10ng/ml)を混合して培養、そこへ IVIg を添加し、IFN- $\gamma$  産生への影響を評価した。

2-4) MPO-ANCA 腎炎患者のサイトカイン動態の特性の検討：血漿中サイトカイン・ケモカインレベルを Bioplex 27plex array について測定し比較した。

2-5) 活性化血管内皮細胞の抑制作用による IVIg の評価

a) TNF- $\alpha$  によって誘導される adhesion molecules の発現の解析：血管内皮細胞内の adhesion molecules の mRNA の発現を PCR、リ

アルタイム RT-PCR で解析した。

b) IgG 作用：TNF- $\alpha$ により誘導される adhesion molecules、サイトカイン、ケモカインの mRNA 発現への IgG の作用の解析

c) IgG 作用：H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>により誘導される adhesion molecules、サイトカイン、ケモカインの発現への IgG の作用

d) IgG 作用：TNF- $\alpha$ によって誘導・産生される培養上清中のサイトカイン、ケモカインの IgG による抑制

### 3) モデルマウスおよび評価系の検討

3-1) CAWS 誘導冠動脈炎：CAWS 4mg を連続 5 日間腹腔内接種し、治療薬による血管炎の有無を病理組織学的に検討した。

3-2) RPGN モデルマウス(SCG/Kj)での治療法の検討：a) 生存延長：SCG/Kj マウスに正常餌および正常餌にコーン油(5%混餌)、あるいは EPA(5%混餌)を第 7 週齢より投与し生存率を観察した。b) 脂質解析：SCG/Kj マウスの 11 週齢における血漿、および腎、肺、脾臓の脂質解析、c) 血漿 MPO-ANCA：血漿 MPO-ANCA 値を ELISA 法で測定した。d) Real time RT-PCR

3-3) 劇症型心筋炎への IVIg 治療評価：EAM の心臓から各細胞を分離し、抗 CD11bc 抗体、抗  $\alpha\beta$  TCR 抗体、マグネットビーズ抗体により心筋細胞、CD11bc<sup>+</sup>細胞、T 細胞、非心筋非炎症細胞(NCNI)細胞を精製し、発現するサイトカイン/ケモカインおよびその受容体の発現量を定量的 RT-PCR にて測定した。心筋炎心筋細胞の遺伝子発現は DNA microarray(Sigma)を用いて、7711 種類の遺伝子発現を検討した。IL-1 の阻害薬も検討した。

### 4) 新たな評価系の開発と発症機構の検討

4-1) 多段差引法および DNA マイクロアレイ解析：性能比較のために別途作製した「感染体チップ」の試作品の検出下限濃度の決定と、測定誤差の詳細な検証を進めた。

4-2) 好中球の機能：野性型と CGD マウスにザイモザンを経鼻投与して肺炎を誘発させ、投与後 1、3、6、および 30 日目のマウスの肺組織切片を H&E 染色後、検鏡した。

### 5) 安定性と毒性試験：

5-1) 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。

5-2) 毒性試験：組み換えグロブリン製剤の毒性：急性、亜急性、生殖発生の毒性試験、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 および関連の治療評価

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判定に 27plex Array を用いて血漿中のサイトカイン・ケモカインを測定した。

### 3) 国際評価関連

国際会議に鈴木和男、小林茂人、藤元昭一の3名が招聘され、2008年3月3-4日と12月1-2日にスイス、チューリッヒの EULAR House で行われ (主任研究者: Richard Watts, Raashid Luqmani)、各国から 33名の研究者が参加した。メールによるアンケート、Evidence の検索、会議にて問題点を確認および多数決で議案を採択した。また、国内での疫学調査も宮崎大学を中心として実施した。今回の調査でも倫理面では患者名が特定できないよう配慮した。

### (倫理面での配慮)

患者の血液・血清の使用に当たっては、各施設の倫理委員会 (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、個人情報にはコード化し、ネットワークでの個人情報交換はしないなど、プライバシー情報の漏洩がないよう万事を期した。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。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. 基礎分科会

1) ヒト型人工免疫グロブリンのクローンの選択と安定性・安全性の評価: セカンドバッチの 115 クローンの中から任意の 60 クローンを選抜し結合活性を検討した。前年度までの個々のクローンの配列解析より重鎖可変領域のアミノ酸配列と抗体アミノ酸配列データベースとの比較解析から、TNF $\alpha$  結合クローンと 85% 程度の同一性を示すものが 5% と比較的多く含まれていた。抗体データベースと完全一致する配列をも

つクローンは含まれていなかったが、生体内で炎症反応を制御している分子として TNF $\alpha$  は重要な分子であり、それとの結合活性を評価することは、ポリクローナル人工ガンマグロブリンの有効性を評価するための良い指標となると考えられる。抗体アミノ酸配列データベースとの比較解析からは、100% 一致したクローンは得られていないが、配列相同性のみによっては結合能を予測することはできないので、有効な ScFv を産生できる 115 クローンからランダムに 60 クローンを選択し、完全還元状態で展開したのちウエスタンブロットにより PVDF 膜上での TNF $\alpha$  との結合活性を検出することを試みた。TNF $\alpha$  との結合は標準的な pH および塩濃度により行った。ScFv は VL-VH 複合体の単量体であり、天然の抗体クローンに比べその結合能は弱くなるものと予想され、検出されたとしても微弱なシグナルであろうことが予想される。

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

### 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た。*In vitro* 評価系では、ヒト末梢血リンパ球、単球、好中球および血管内皮細胞を用いて、評価系を構築した。

#### 2-1) 免疫細胞への作用:

##### a) IgG のプレートへの吸着量の測定

a-1) 種々のプレートへの吸着量: IVIg のプレートへの吸着量を比較するため、5 種類のプレートに IVIg を段階希釈して添加し、検討した。その結果、BM 社以外のプレートは、IVIg の吸着量はほとんど同程度であった。そこで以降の実験には SUMILON F を使用した。

a-2) IVIg 希釈溶媒の検討: IVIg をプレートに効率よく吸着させるために希釈する溶媒の pH について検討した。その結果、pH6、7、8 では吸着量に差はなかった。次に、リン酸緩衝液とアルギニン水溶液、PBS で IVIg を希釈して比較したところ、リン酸緩衝液で希釈したものの吸着量が著しく高かった。

b) ヒト末梢血単核球 (PBMC) の固相化 IVIg によるサイトカイン産生測定のための至適条件の検討

b-1) IVIg による全血培養上清への IL-8、TNF- $\alpha$  産生の経時変化: 全血培養に IVIg を添加 (final 0, 5, 500  $\mu$ g/ml) し、さらに final 1ng/ml の LPS で刺激し上清中の IL-8、TNF- $\alpha$  の産生量を経時的に観察した。その結果、IL-8 産生量は LPS の有無に関わらず 48 時間まで経時的に増加し

たが、TNF- $\alpha$  産生量は 8~12 時間をピークに減少した。これらの結果より、今後の培養時間を 8 時間に固定した。

b-2) ヒト PBMC を固相化 IVIg (Solid phase) あるいは IVIg の添加 (Liquid phase) で刺激し、IL-8、TNF- $\alpha$  産生を観察した。その結果、LPS の刺激の有無に関わらず IVIg の添加での IL-8 の産生誘導はほとんど観察されなかった。TNF- $\alpha$  産生も、IVIg の添加では LPS 刺激の高濃度添加でのみ観察された。一方で、固相化した IVIg は IL-8、TNF- $\alpha$  とともに IVIg の容量依存的に著しく産生量が上昇した。LPS を添加するとそれらの産生量はさらに増加した。

b-3) 固相化 Albumin による PBMC からの IL-8、TNF- $\alpha$  産生：固相化 IVIg の IL-8、TNF- $\alpha$  産生誘導が IVIg によるものであることを確認するため、albumin を IVIg と同様にプレートに吸着させて固相化 albumin を作成し、PBMC からの IL-8、TNF- $\alpha$  産生誘導を検討した。その結果、albumin も IVIg と同様にプレートに吸着したが、PBMC を添加しても IL-8、TNF- $\alpha$  の産生は観察されなかった。

c) Bio-Plex を用いた PBMC からのサイトカイン・ケモカインの網羅的解析：前述の結果より、固相化 IVIg による PBMC からの IL-8、TNF- $\alpha$  産生誘導が観察できる培養条件を用いて、Bio-Plex で 17 種のサイトカインを網羅的に測定したところ、固相化 IVIg により産生が誘導されないもの (IL-2、IL-4 など)、固相化 IVIg の容量依存的に産生が観察されるもの (IL-1 $\beta$ 、IL-6 など)、検出限度を超えるほど著しい産生が観察されるもの (IL-8、MIP-1 $\beta$  など) の 3 群に分けることができた。さらに LPS を添加したところ、ほとんどのサイトカインの産生量は上昇し、固相化 IVIg 容量依存的であったが、IL-10、MCP-1 の産生は固相化 IVIg によって抑制された。これらの結果から、固相化 IVIg は PBMC からのサイトカイン産生に変化を与えることが明らかとなった。

(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]、主任研究者、研究協力者)

#### 2-2) 全血法によるサイトカイン産生能の検討

PHA 20 時間刺激により多くの場合 GM-CSF の産生は、わずかしこ認められなかったが、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、IL-12p70、IL-13、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  の産生が認められた。Th1 サイトカインである IL-2、IL-12p70、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  の産生に対し、0.05、0.5mg/ml の IVIg 添加では、Th1 サイトカイン産生はむしろ亢進するケースも認

められたが、5mg/ml の IVIg の添加では、無添加の場合と比較して、各サイトカインの産生は抑制された。また、IL-5、IL-10 についても Th1 サイトカインと同様、0.05、0.5 mg/ml の IVIg 添加では無添加時よりサイトカイン産生が亢進するケースも認められたが、5mg/ml の IVIg では、全員のサイトカイン産生の抑制が認められた。特に、IL-10 の産生抑制は顕著であった。また、0.05mg/ml の IVIg 添加で各サイトカインの産生が抑制される人と、より高濃度でないと抑制されない人がいることが明らかになった。また、4 倍に希釈した LPS 2 $\mu$ g/ml 刺激サイトカイン産生についても同様に、IVIg の影響について検討した。LPS 刺激については 5mg/ml の IVIg 添加でも産生抑制の認められないサイトカインも数多くあったが、IL-10 産生については 5mg/ml の IVIg 添加で、IL-10 産生の抑制が認められた。

(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)

#### 2-3) 単球の抗原提示能に対する IVIg の影響：

MPO-ANCA 腎炎患者の単球と健康人 CD4<sup>+</sup>T 細胞、抗 CD3 抗体を用い IVIg の影響を検討した。その結果、Fc 部分には特に抑制効果は認められなかったが、1、10mg/ml の IVIg 添加で IFN- $\gamma$  産生の抑制が認められた。さらに、人工 $\gamma$ グロブリン製剤の評価系にこの系を適用することを考え、単球にかえて株細胞を用いて検討した。単球に代えて単球系細胞株である Thp-1、U937 細胞でも、IVIg の影響を認める事が可能であった。IVIg の添加時間は、反応開始時が顕著ではあったが、8 時間後でも十分に IFN- $\gamma$  産生を抑制できる事が明らかにされた。また同様に健康人 CD4T 細胞に代えて、Jurkat 株等について検討したが、現時点では成功していない。

(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)

#### 2-4) MPO-ANCA 腎炎患者のサイトカイン動態の特性の検討：

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 腎炎において、27plex array のうち、RANTES を除き、26 項目のサイトカイン・ケモカインを測定した。健康人に比較して MPO-ANCA 腎炎患者で、IL-1 $\beta$ 、IL-1Ra、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、MCP-1、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、PDGF-bb、VEGF が有意に上昇していた。一方、IgA 腎症では、IL-9、IL-17、PDGF が上昇してい



た。また、IL-8, IL-15 はむしろ低下していた。即ち、IL-9, IL-17, PDGF-bb は両腎炎に共通して上昇していたが、他のサイトカイン・ケモカインは、MPO-ANCA 腎炎で特異的に上昇していた。(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)

## 2-5) 免疫グロブリンの血管内皮細胞への作用解析法の検討

a) TNF- $\alpha$  によって誘導される adhesion molecules の発現の解析: 血管内皮細胞を TNF- $\alpha$  で刺激し、Adhesion molecules である E-selectin, VCAM-1, ICAM-1 の mRNA の発現を解析した。その結果、TNF- $\alpha$  により、これら adhesion molecules の発現は、いずれも上昇した。また、TNF- $\alpha$  の処理のタイミングによる E-selectin, VCAM, ICAM-1 の上昇の差はほとんど認められなかった。

b) IgG 作用: TNF- $\alpha$  により誘導される adhesion molecules、サイトカイン、ケモカインの mRNA 発現への IgG の作用の解析: TNF- $\alpha$  で血管内皮細胞を刺激したときの接着分子、サイトカイン、ケモカインの発現をリアルタイム PCR で解析した結果、GM-CSF、MIP-1 $\beta$ 、MIP-2、KC、MCP-1、IFN  $\beta$ 、IL-6 の発現が上昇した。また、IgG 処理により、発現が抑制されたサイトカイン・ケモカインは、とりわけ、GM-CSF、MIP-1 $\beta$ 、MIP-2、KC、IFN  $\beta$ 、IL-6 は、IgG 濃度依存的に強く抑制された。

c) IgG 作用: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> により誘導される adhesion molecules、サイトカイン、ケモカインの発現への IgG の作用: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加して血管内皮細胞を刺激し、細胞の VCAM-1, E-selectin, ICAM-1 の発現および IgG によるその発現への作用を解析した。その結果、いずれの adhesion molecules も IgG により抑制された。また、MIP-1 $\beta$ 、MIP-2、KC、MCP-1、IFN  $\beta$ 、IL-6 の発現が上昇した。また、IgG 処理により、発現が抑制されたサイトカイン・ケモカインは、MIP-1 $\beta$ 、MIP-2、KC、MCP-1、IFN  $\beta$ 、IL-6 に見られたが条件によりその作用は弱い場合があった。しかし、MIP-2、IFN  $\beta$ 、IL-6 の発現の抑制は、顕著であった。

d) TNF- $\alpha$  により誘導される adhesion molecules、サイトカイン、ケモカインの発現への IgG の作用の解析: TNF- $\alpha$  で血管内皮細胞を刺激、そのときの接着分子、サイトカイン、ケモカインの産生を ELISA、Bioplex を用いて解析した。その結果、Bio-Plex で顕著に影響が見られたサイトカイン・ケモカインのうち、KC、MCP-1、TNF $\alpha$  を ELISA にて確認した。MCP-1 は、高濃度の IgG で

は上昇したものの、これらのサイトカイン・ケモカインは、IgG 処理により培養上清中の濃度は、減少した。これらの効果は、IgG 中に含まれる特異抗体によることがわかった (data not shown)。

以上の結果から、TNF- $\alpha$  あるいは H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> によって活性化される血管内皮細胞を抑制する IgG の作用が認められた。

(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)

## 3) モデル動物による治療効果の評価

### 3-1) CAWS 誘導冠状動脈炎

CAWS 誘導冠状動脈炎への抗体医薬の効果を検討した。抗体医薬のインフリキシマブ、エタネルセプト投与群共に、対照群と比較して血管炎発生頻度は抑制傾向を示した。血管炎の組織像は対照群との間で差異を見出せなかった。両薬剤共に投与による心筋障害は観察されなかった。

(高橋啓[東邦大学医療センター大橋病院病理]、協力者)

### 3-2) RPN モデルマウス(SCG/Kj)での治療法の検討

a) 生存延長: SCG/Kj マウスの正常餌群とコーン油群には生存率の差を認めなかったが、EPA 投与群は著明な生存延長を認めた。

b) 脂質解析: Omega-6 系の不飽和脂肪酸として DGLA(ジホモ $\gamma$ リノレン酸)、AA(アラキドン酸)、Omega-3 系の不飽和脂肪酸として EPA(エイコサペンタエン酸)、DHA(ドコサヘキサエン酸)を測定した。DGLA および AA といった Omega-6 PUFA は正常餌群と比してコーン油群で増加し EPA 群で著明に抑制された。EPA 含量は正常餌およびコーン油群ではほとんど検出されず、EPA 投与群で高値を示したことから完全に食餌依存性であることがわかる。DHA は各群で有意差を認めなかった。腎臓および肺、脾臓の各臓器においても同様の脂質組成であった。

c) 血漿 MPO-ANCA: 11 週齢における血漿 MPO-ANCA 値を ELISA 法で測定した。正常餌群およびコーン油群で抗体価は有意に上昇し、EPA 投与群ではこの上昇がほぼ完全に抑制された。14 週齢においても同様の結果であった。

d) 正常餌、コーン油群では 10 週齢頃より死亡するマウスが出てくるが、1 週間程前より血尿を来すものが多く腎組織および生化学的解析に

より半月体形成性腎炎と腎不全を呈することがわかった。EPA 投与群では全マウスが14週齢まで生存し腎病理組織や生化学検査においても半月体形成性腎炎や腎不全は認めなかった。EPA は腎炎や血管炎の発症を抑制することにより生命予後を改善している可能性が示唆される。

e) Real time RT-PCR: 正常餌群と EPA 投与群を比較して遺伝子発現の有意差を認めたものは、腎臓における Foxp3 と CTLA-4 である。前者は制御性 T 細胞に特異的に発現する転写因子であり、後者は抑制性の共刺激因子で制御性 T 細胞の重要な機能を担う分子であると報告されている。従って、末梢臓器の腎臓において制御性 T 細胞が誘導されている可能性が考えられる。なお、肺および脾臓においては2群間で Foxp3 と CTLA-4 の遺伝子発現に有意差を認めなかった。今後、フローサイトメトリーにより直接各臓器における制御性 T 細胞の検出を行っていく。

(平橋淳一 [東京大学医学部府付属病院腎臓内分泌内科]、長尾朋和 [千葉大学大学院・医学研究院]、主任研究者、研究協力者)

### 3-3) 劇症型心筋炎への IL-1RII-Ig の治療評価

EAM の心臓中の T 細胞は、IL-2、IFN- $\gamma$ 、IL-17 が発現し、CD11b<sup>+</sup>細胞からは、IL-1 $\alpha$  および  $\beta$ 、TNF- $\alpha$  が発現していた。しかし、NCNI 細胞にも、それらの受容体は明らかに発現が認められ、MCP-1、IL-6、G-CSF は、むしろほとんどが NCNI 細胞で発現が認められた。サイトカイン/ケモカインの時間経過を見ると、初期には IL-1、IL-17、IL-2、IL-6、MCP-1 の発現が認められ、一方 IL-10 は回復期に認められた。また、初期に上昇していたそれらは、炎症細胞浸潤があまり病理学的に認められない組織中で明らかに上昇していた。心筋炎の組織から得られた培養細胞に、IL-1 や IL-17 を添加すると、IL-6、MCP-1 の発現誘導が認められた。また異なる細胞が発現すると考えられる IL-1 と IL-6 や MCP-1 の組織中発現量の相関関係は、非常に良好であった (IL-1 vs IL-6,  $r=0.951$   $p<0.0001$ ; IL-1 vs MCP-1,  $r=0.944$   $p<0.0001$ )。以上より、心臓内の樹状細胞と病的 T 細胞の接触により産生されたサイトカインが、NCNI 細胞などに働き、IL-6、MCP-1、G-CSF などのサイトカイン/ケモカインを誘導し、炎症細胞の浸潤を誘導するのではないかと推測した。心筋炎心臓の DNA microarray の解析では、PAP(pancreatitis associated protein)/Reg(regenerating gene), alpha 2 $\mu$  globulin-related protein, Collagen XVIII, NCAM などが正常心筋細胞に比し、非常に発現が亢進していることが

明らかになった。これらの一部は、抗菌蛋白あるいは鉄代謝に関連するものであり、最近注目されている蛋白であった。IL-1 の阻害薬の検討では、IL-1RII-Ig のホモダイマー、IL-1RAcP-Ig のホモダイマーに比べ、それらのヘテロダイマーが桁違いに阻害作用を有していた。これは、現在臨床で使われつつある IL-1R アンタゴニスト(anakinra)に比し、約 10000 倍強力な効果であった。

(相澤義房 [新潟大学大学院医歯薬大学院]、研究協力者)

## 4) 新たな評価系の開発と発症機構の検討

### 4-1) 多段差引法および DNA マイクロアレイ解析

まず、この性能比較のために別途作製した「感染体チップ」の試作品について、合計 16 回の測定データについて誤差解析を進めた結果、測定繰り返し誤差は 1%以下、アレイ間の誤差は 3%以下という驚異的な正確さで測定されることが判明した。健常人の血液細胞から抽出した mRNA を用いて作製したプローブを用いて不明熱・膠原病診断チップをスクリーニングした場合でも 4 回連続に測定した値の間の誤差はきわめて低い事を検証した。この結果は、不明熱・膠原病診断チップの品質が極めて優れている事を示す。

次に、12 名の高安病血管炎の患者から採血サンプルから調製した mRNA をプローブとし、健常人由来の mRNA を比較プローブとして用いて不明熱・膠原病診断チップをスクリーニングした。その結果、搭載した 216 個の遺伝子のうち 28 遺伝子について高安病血管炎の患者での発現亢進が検出できた。一方、ジェノパールに搭載してある、多くの自己免疫疾患患者の血液細胞で共通に過剰発現していることを我々が見出した G0S2 遺伝子について詳細な機能解析を進めた。この結果は、抗 G0S2 抗体が血液細胞抽出液をサンプルとした新たな免疫検出マーカーとして有用である可能性を示唆する。(野島 博 [大阪大学微生物病研究所])

### 4-2) 好中球の役割の解析

血管炎に関与する好中球の機能を解析した。野性型と CGD マウスにザイモザンを経鼻投与して肺炎を誘発させ、投与後 1、3、6、および 30 日目のマウスの肺組織切片を H&E 染色後、検鏡した。野性型マウスは、ザイモザン投与後 1 日目から 6 日目までごく軽度の肺炎が持続したに過ぎなかった。それに対して、CGD マウス肺の炎症の程度は、投与後 1 日目には、すでに野性型マウスよりも重篤になり、6 日

目まで経時的に重篤化し、少なくとも30日目まで沈静化は見られなかった。次に、肺胞内に浸潤している細胞を肺胞洗浄で回収し、肺に集積している炎症細胞数を血球計算盤で計測した。ザイモザン非投与群の細胞数に有意な差は見られなかったが、CGDマウスでは、ザイモザン投与後1日目には、すでに野性型マウスの約1.8倍の細胞が集積した。ザイモザンを投与することによって最も顕著に増加したのは好中球であった。ザイモザン投与後6時間目には、野性型マウスではほとんどがマクロファージであったのに対して、CGDマウスでは好中球が集積していた。CGDマウスの好中球数は、ザイモザン投与後6日目にかけて経時的に著しく増加した。以上のことから、CGDマウスにザイモザンを経鼻投与すると好中球性の肺炎が誘発され、野性型マウスに比べ肺炎が重篤になることが明らかとなった。

(荒谷康昭[横浜市立大学大学院国際総合科学研究科])

## 2. 臨床班

### 1) MPAの治療評価にむけての腎機能のパラメータの検討

1-1) IgA腎症では正常人に比してIL-6, IL-15, IL-17, PDGFが上昇していたが、MPAではおびただしい数のサイトカイン、ケモカインが正常人やIgA腎症者に比して上昇しており、サイトカインストームの実態を示した。

1-2) サイトカイン・ケモカインと、各種臨床パラメーターとの関係性について、血尿、タンパク尿: IL-15, IL-18, MCP-1, MCSFが血尿の程度と正の相関を示した。蛋白尿については、さらにIL-12p40の程度が正の相関を示した。さらに腎機能については、IL-8が正の相関を示した。活動性、半月体形成病変との相関性は再現性がなかった。Stem cell factor(SCF)については、従来より、硬化性病変との相関を見ていたが、MCSFも、糸球体線維性半月体形成、間質線維化などと正相関を示した。また、血中interferon inducible protein (IP-10)(CXCL10)は硬化所見と負の相関を示し、ケモカインとしての特殊性を暗示した。IL12p40は病変のある糸球体および血管病変と連動していることが確認された

(武曾恵理[北野病院]、臨床班分科会員および協力研究者)

初回IVIg反応例は、男児33症例、女児16症例の49症例、不応例は男児13症例、女児18症例の31症例である。年齢、性、WBC、TB、は、両群間、IVIg療法前後共に有意差を認めなかった。IVIg療法前CRPは、反応例 $3.02 \pm 1.65 \text{mg/dl}$  (n=49)、不応例 $7.85 \pm 4.01 \text{mg/dl}$  (n=31)、 $p=0.00015$ であった。またCO濃度は、反応例 $309 \pm 21 \text{ppm}$  (n=49)、不応例 $352 \pm 38 \text{ppm}$  (n=31)、 $p=0.0117$ であり、CRP値、CO濃度ともに、不応例は反応例に比較して有意に高値であった。次にIVIg療法前後のCRP値の変動は、反応例前 $3.02 \pm 1.65 \text{mg/dl}$  (n=49)、反応例後 $0.53 \pm 0.38 \text{mg/dl}$  (n=49)、 $p=0.0007$ 、不応例前 $7.85 \pm 4.01 \text{mg/dl}$  (n=31)、不応例後 $3.58 \pm 2.87 \text{mg/dl}$  (n=31)、 $p=0.0367$ であり、反応例、不応例ともにIVIg療法により有意に低下したが、不応例の後値は反応例の前値より高値を呈していた。一方、IVIg療法前後のCO濃度は、反応例前 $309 \pm 21 \text{ppm}$  (n=49)、反応例後 $247 \pm 19 \text{ppm}$  (n=49)であり、反応例ではIVIg療法後のCO濃度に有意( $p=0.0158$ )な低下を認めた。しかし不応例では、IVIg療法前 $352 \pm 38 \text{ppm}$  (n=31)、IVIg療法後 $411 \pm 53 \text{ppm}$  (n=31)となり、CO濃度は有意な低下は認められず、むしろ増加傾向を示した。(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) 腎炎の治療

1例目は11歳にて発症したPR3-ANCA関連糸球体腎炎の男性で、腎不全に至り、その後腎移植を受けたが、ANCA関連腎炎が再発し、さらに心内膜炎の合併した症例である。血液培養は陰性で、抗菌薬には反応せず、ステロイドパルス療法と免疫抑制薬により軽快した。この症例は、大動脈弁の無冠尖に穿孔し、大動脈弁閉鎖不全を認めた。肺炎で死亡後の剖検で大動脈弁の線維化と癒着化を認めた。2例目は67歳のPR3-ANCA関連腎炎の男性で、経口ステロイドによる治療中に無菌性心内膜炎を発症し、大動脈弁置換術を受けた症例である。文献的に無菌性心内膜炎を発症するANCA関連糸球体腎炎を調べると、全例で15症例が報告されており、いずれもPR3-ANCA陽性であるが、MPO-ANCAは陰性であった。これらの症例に共通するのは、強いANCA関連血管炎の症状が続き、糸球体腎炎に加えて、大動脈弁の障害が認められることである。(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)

### 2) 川崎病のIVIg治療評価

### 4) MPO-ANCA関連腎炎の感染症と治療

患者1は、67歳女性。生来健康で健診・病院受診歴なし。2008年1月頃から咳嗽、全身倦怠感自覚していたが、放置。3月になって尿量減少に気づき、体動時に動悸を自覚するようになり近医受診した。腎機能低下と貧血を認め入院となったが、両肺野に浸潤影、血痰を認め、当内科に転院となった。MPO-ANCA544U/mlであった。透析導入しつつ加療を行ったが、気胸をおこし胸腔鏡下肺ビソール閉鎖術施行。その頃喀痰より *Aspergillus Fumigatus* 分離検出。その後肺結核で死亡した。ステロイドパルス療法後ステロイド薬投与を継続し、MPO-ANCAは陰性となっていた。患者2は、66歳男性。生来健康であったが、2006年食欲不振、蛋白尿・血尿、腎機能低下で発症。MPO-ANCA214U/mlであったが、ステロイドパルス療法、経口ステロイド薬でMPO-ANCA陰性化していた。2008年4月蛋白尿・血尿出現、MPO-ANCAも27U/mlに陽性になった。1日3mgになっていたステロイド薬を40mgに増量、腎機能も尿所見も改善出来た。ステロイド薬10mgの時点で6月発熱、皮下腫瘍、咳が出現。Nocardia感染症と診断し、加療を行い、脳にもあった腫瘍も改善した。同時にMPO-ANCA陰性となっていた。ステロイド薬1日3mgまで減量できていた。12月発熱、血清クレアチニン上昇、再燃も考えたが、MPO-ANCA陰性のままであった。Cryptococcal脳炎と診断。加療を行い軽快傾向にある。両患者とも腎生検で半月体形成性腎炎であることは確認した。

(湯村和子[自治医科大学腎臓内科]、研究協力者)

## 5) IVIg有効治療成績

全例が臨床的に急速進行性糸球体腎炎を呈し、4例中3例に肺病変(間質性肺炎、肺泡出血、結節性病変がそれぞれ1例)、消化管出血を1例に認め、顕微鏡的多発血管炎を呈していた。初診時のMPO-ANCA値は230・970(平均622)EU/l、CRPは4.5-23.4(平均16.2)mg/dl、s-Creは2.2-4.7(平均2.9)であった。4例とも厚労省RPGN診療指針の通りにステロイド投与、3例でメチルプレドニゾン・パルス療法を施行し、後療法プレドニゾン0.6~0.8mg/Kg/dayから開始した。以降治療反応性を見つつ漸減した。免疫抑制薬としては、2例でプレドニゾン減量時にシクロフォスファミドを併用した。初期治療からIVIg開始までの期間は2か月から30か月。IVIgは0.2~0.4g/kg/dayで、5日間。IVIg開始時症状は感染症と完全に鑑別することは不可能で、抗生物質を併用しつつ、ANCA titerの増加も認められることから、血管炎再燃と判断し、IVIgを施行し

た。IVIg開始時の血管炎治療薬としての併用薬は、全例はPSL25-30mg/dayを使用されており、2例でCPA50mg/dayもしくは50mg/隔日投与の併用が行われていた。IVIg開始時のMPO-ANCA値は11-88EU/l(平均51.8)、CRP0.6-6.4mg/dl(平均3.5)、腎機能は1例ですでに末期腎不全のため透析導入されており、その他の3例のs-Creは1.2-1.9mg/dl(平均1.46)であった。CRP陰性化までの期間は平均17.8日(5-47日)であり、消化器症状にて再燃した3症例については、速やかに炎症所見は改善し5日から10日間でCRPは陰性化した。一方、間質性肺炎増悪での再発症例はIVIg後にステロイドパルス療法も施行したが、47日間の経過にてCRPが陰性化した。MPO-ANCA値は、一ヶ月後には2例で陰性化し、それ以外の2例でも半減していた。

(山縣邦弘[筑波大学院医学研究科]、研究協力者)

## 6) 国際評価関連

### 6-1) 国際会議

第一回の会議(2008年3月、チュリッヒ)の前にアンケートが行われ、論議すべき問題点が集計された。2)ACR分類・CHCC基準のよい点・悪い点について、各疾患について改訂の必要性についてアンケートが行われた。結果は、ACRおよびCHCC両者とも大型血管炎の基準に対する改訂必要の希望者は多くなかったが、中小血管炎の基準に対する改訂希望が多かった。4)疾患名の変更に關する提案が行われた。これはWegenerがナチスに關与したという推定に基づくことである。このような事例は、「ライター症候群」が「reactive arthritis」の呼称の変更が行われたことと同じ理由に基づく。実際の結論は、現行の疾患名の変更は行わないこと、Wegenerについては事実の調査を継続すること、コメントを記載することの結論になった。

第1回の会議で議論されたさまざまな問題点について、血管炎の分類方法に關して重要な概念が確認された。1)症候群やサブグループに対しては、可能な限り病態生理学的の観点からの階層制で表現する。2)症候群と一次性/二次性血管炎との間でのオーバーラップについては、症候群が一次性か二次性血管炎か、関連性の深い選択肢に分類される。3)診断の信頼性をその状態においてDefinite, Probable, Passibleの段階に定義する。個々の症例では診断の信頼性がより確実な方向に変化する。4)小児の血管炎、血管炎の類似疾患、非炎症性血管障害も分類上

考慮する。これらの基本方針に基づき、今後 prospective に、定義・概念、分類基準、階層制など血管炎の個々の症例を対象に検証を行う予定である。

(小林茂人[順天堂大学医学部附属越谷病院]、研究協力者)

## 6-2) 国際疫学に関連した国内調査

ANCA-associated PRV として登録された数は前回の4年間調査での総数50例に対し、今回の調査では2005年、2006年、2007年、2008年にそれぞれ11例、17例、16例、17例の総数61例で、男女比は前回の22:28に対し、33:28であった(1, 2)。2004年までの4年間調査での平均年齢は70.4±11.1歳、今回の4年間の調査では71.3±11.8歳と同等であり、65歳以上が47%、発症のピークは75~80歳であった

(藤元昭一[宮崎大学医学部]、布井博幸[宮崎大学医学部]、研究協力者)

## 7) 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、あらたな治療法としてヒト型のプロトタイプを作製できた。また、体外診断法にむけた *in vitro* での評価法を検討し、疾患モデル動物での評価も推進した。さらに、小児に多発する血管炎である川崎病や、高齢者に多い MPO-ANCA 関連血管炎の治療法としての IVIg のデータの蓄積や、他の治療法などの検討を継続的に行った。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

1、2年目で作成されたポリクローナル人工ガンマグロブリンの製剤化に向けて必要とされる確かな性状を保證する意味においてバッチ内に含まれるクローンの多様性が保持されていることを確認し、また抗体アミノ酸配列データベースとの比較から、常在病原微生物に対するイデ

イオタイプや生体内で様々な反応を制御するシグナル分子に対するイディオタイプを含んでいることを確認してきた。TNF $\alpha$ などの炎症性サイトカインやその他のシグナル分子に対するイディオタイプが健常者の体内で保持されていることは、これらのイディオタイプが炎症反応などの調節に関わっていることを示す証左でもある。本研究班の分担者、高橋、大野、宇野らによって生体内および試験管内でポリクローナル人工ガンマグロブリンの有効性を検証する結果が示されていることは、製剤としてのポリクローナル人工ガンマグロブリンにさらに近付いていると考えられる。

本研究においては、多様性の解析および配列解析から生体内で作用しているシグナル分子に対する抗体、とりわけ炎症性疾患の制御に関与している TNF $\alpha$ に対する抗体分子と相同性の高い可変領域を持つクローンが比較的頻度高く見出されたことから、実際に作成されたポリクローナル人工ガンマグロブリンに含まれるクローンが TNF $\alpha$  と結合するかを検証し60クローンの内2種のクローンが結合する結果を得た。昨年度行った抗体データベースと可変領域のアミノ酸配列相同性の結果から、抗 TNF $\alpha$ 抗体と85%程度の相同性を示すものが5%程度含まれていたが、実際の結合活性の検証では2/60の3%と同程度の割合を示している。解析を行ったクローン数がまだ少なく確定的ではないが、1種類の生体内シグナル分子である TNF $\alpha$  に対して2/60のクローンが結合性を示したことは、生体内で作用する自己の調節因子に対する抗体が比較的高率に存在していることを示していると考えられ、これらの自己抗体が炎症反応などの生体反応の調節に重要な役割を果たしていることを示す結果と考えられる。ポリクローナル人工ガンマグロブリンのバッチに実際に生体内調節因子に結合するクローンが含まれていることを実証できたことはポリクローナル人工ガンマグロブリンの製剤化に向けてさらに前進できたと考えられる。配列解析および整列化できたクローンはプライマリーバッチ、セカンダリーバッチ合わせて200クローン程度であり、生体内でのイディオタイプ多様性を考えたときに数百倍程度の整列化クローンバッチを整備することが望まれる。このためには高効率のライブラリー作成法の開発とクローン解析整列化の自動化が必要である。製剤化に向けてさらに研究を進める必要があるものと思われる。

### 2) *in vitro* 評価系の開発

人工γグロブリンの有効性を検証する測定系

を検討した。第一の測定系は、全血を希釈し、PHAで刺激した際に、IVIgを添加、Th1/Th2サイトカインの産生抑制を検証した。その結果測定したサイトカイン全てで、高濃度のIVIg添加で、産生抑制が認められることが明らかとなった。またこの系で抑制効果の認められる濃度に個人差があることから、治療の適用の可否の判断につかえる可能性も示唆された。とりわけ、IL-10の産生抑制は顕著であった。この測定系は0.5cc程度の血液があれば測定可能な事から、実用性は高いと思われる。

また、単球のT細胞刺激能へのIVIgの影響についても検証し、その有用性が明らかにされた。現段階では測定のために、健康人CD4T細胞が必須であるので、より汎用性の高い測定系とするためには、単球に代えて単球系細胞株の使用のみならず、CD4T細胞についても細胞株を用いて、検証できるようにする必要があると考えられた。今後、IFN- $\gamma$ 以外のサイトカインについても、検討する事で、人検体に依存しない評価系の開発が期待できる。またIVIgの作用機作解明のために、対象疾患であるMPO-ANCA腎炎患者の血漿中サイトカイン・ケモカインレベルを健康人、IgA腎症患者と比較しつつ調べたところ、測定出来た26項目中17項目が、健康人、IgA腎症患者と比較して有意に上昇していた。即ち、IL-9、IL-17、PDGF-bbは両腎炎に共通して上昇していたが、他のサイトカイン・ケモカインは、MPO-ANCA腎炎で特異的に上昇していた。IL-9上昇は両者の発症のきっかけとなる気道アレルギーとの関連、IL-17は組織障害、PDGF-bbは腎局所の炎症やメザンギウム増殖との関連が考えられた。このように、多項目サイトカイン・ケモカイン動態の網羅的解析は、病態、病因の理解に有用であることが示唆された。

さらに、*in vitro*での体外評価に利用できる血管内皮細胞による評価法を検討した。1) TNF- $\alpha$ によって誘導されるadhesion moleculesの発現を解析し、adhesion moleculesのE-selectin, VCAM, ICAM-1のmRNAの発現を解析できた。2) TNF- $\alpha$ により誘導されるadhesion molecules、サイトカイン、ケモカインの発現へのIgGの作用を検討し、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を用いて解析できた。また、3) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>により誘導されるadhesion molecules、サイトカイン、ケモカインの発現へのIgGの作用については、VCAM-1, E-selectin, ICAM-1やサイトカイン、ケモカインの発現をしらべ、IgGの作用の解析法としても利用できる可能性を示した。さらに、4) TNF- $\alpha$ によ

って誘導・産生される培養上清中のサイトカイン、ケモカインもIgGによって抑制を解析できることがわかった。以上から、免疫グロブリンの血管内皮細胞への活性化抑制作用の分子解析により、*in vitro*での評価系を確立する方向が示された。特に、炎症の指標として、TNF- $\alpha$ やH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によって血管内皮細胞を活性化し、ICAM-1, VCAM, E-selectinやサイトカイン、ケモカインの発現・産生を人工ガンマグロブリンやIgGによって抑制されるかを調べる事が可能となった。これらの評価法は、血管炎治療効果の判定に向けた開発につながる事が期待できる。

### 3) モデル動物での評価系

CAWS誘導血管炎モデルの実験系ではCAWS投与後血清TNF- $\alpha$ が上昇することが示されており、TNF- $\alpha$ の作用を阻害することで血管炎の発生や炎症の進展を抑制できる可能性がある。今後、投与条件などを変更し、さらなる検討を行う予定である。

一方、劇症型心筋炎へのIL-1R<sub>II</sub>-Igの治療評価においては、今までは、線維芽細胞、平滑筋細胞については、それほど積極的に炎症に関わっていないのではないかと考えられていた。しかし、最近、筋線維芽細胞が、他の臓器でも様々なサイトカイン/ケモカイン/成長因子を産生し、またそれらの受容体を持つことが明らかになってきた。今後、血管炎の機序を考える上にも、重要な細胞として詳細に検討する必要があると考える。またDNA microarrayによって網羅的な遺伝子発現の検討が可能になったため、今まで注目されなかった蛋白の重要性が、様々な分野で明らかになってきている。今回浮かび上がった抗菌蛋白や鉄関連蛋白は、再生、活性酸素種(ROS)、アポトーシスなどに深く関わっていると想定される蛋白である。今後、その作用を明らかにする必要がある。バイオマーカーや治療薬の開発につながる可能性もある。IL-1の阻害薬の検討では、驚くほど強力なIL-1阻害作用が、IL-1R-Igヘテロダイマーでみられた。IL-1は、他の炎症でも中心的な役割を果たすサイトカインである。この生物学的製剤は、今後血管炎でも有用になる可能性があると思われる。

## 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今年度も推測できた。これらのパラメーターの選択には、欧州血管炎協会(EUVAS)で採択されており、国際評価会議からも要請があり、当班からも運営委員として2名、オブザーバとして1名が参加し、討論に加わった。

## 2) 川崎病のIVIg治療評価

川崎病の病態の主座は全身の中小動脈の血管炎であり、単球/マクロファージでの転写因子 nuclear factor kappa B(NFκ-B)の活性化を介した tumor necrosis factor alpha(TNF-α), interleukin(IL)-1,IL-6などの炎症性サイトカインによる接着因子の発現増強と、単球の接着が関与していることが示されている。生体内でヘムオキシゲナーゼ(heme oxygenase:HO)はheme蛋白の補欠分子族であるprotohemeを基質としてhemeと等モルのCOと還元鉄(Fe<sup>2+</sup>)、ビリベルジンを生成する酵素であり、これらの生成物質は多彩な生理作用を持つ。COはIL-10などを介して抗炎症作用を発揮する。HO-1は誘導型で酸化ストレス、サイトカインなどの多彩な刺激でその活性が誘導され、生体の恒常性を保つ役割を担っている。

以上から、臨床応用に向けたヒト型人工免疫グロブリンの開発、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伝えるようする。

## 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、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、1)ヒト型人工免疫グロブリン作製とその品質と体外評価法の開発にむけ検討し、免疫細胞への作用(ヒト末梢血単核球(PBMC)の固相化IVIgによるサイトカイン産生測定、Bio-Plexを用いたPBMCからのサイトカイン・ケモカインの網羅的解析)、全血法によるサイトカイン産生能の検討、単球の抗原提示能に対す

るIVIgの影響、免疫グロブリンの血管内皮細胞への作用解析法の検討(TNF-αによって誘導される adhesion moleculesの発現の解析、IgG作用:TNF-αにより誘導される adhesion molecules、サイトカイン、ケモカインのmRNA発現へのIgGの作用の解析、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>により誘導される adhesion molecules、サイトカイン、ケモカインの発現へのIgGの作用、TNF-αにより誘導される adhesion molecules、サイトカイン、ケモカインの発現へのIgGの作用の解析)があげられる。そして、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については、CAWS誘導冠状動脈炎、RPGNモデルマウス(SCG/Kj)での治療法の検討を中心に行った。

以上から、ヒト型人工免疫グロブリンのプロトタイプ完成と、その*in vitro*での評価法の準備ができたので、今後は具体的に臨床応用をめざしたヒト型人工免疫グロブリンの完成と、体外評価法として発展させる。本研究事業での臨床班および基礎班で成果を、国民の保健・医療ならびに効率的な医療経済に伝えるようにしたい。

## 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(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)。また、国際評価委員会に3名の招聘があった。

## F. 健康危険情報

今年度は、特になし。

## G. 研究発表:(分担者の項の記載を参照)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

- 1) 生物学的製剤(相澤義房)  
国際出願(PCT/JP2008/051457)

- 2) ANCA関連血管炎治療薬(平橋淳一)  
(出願日2008.8.22)

- 付属資料-1 第一回班会議プログラム  
付属資料-2 第二回班会議プログラム  
付属資料-3 公開成果発表会プログラム

## 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

研究分担者 亀岡洋祐（独）医薬基盤研究所・生物資源研究部 主任研究員

研究分担者 大島正道 国立感染症研究所・免疫部 室長

研究代表者 鈴木和男 千葉大学大学院医学研究院 特任教授

**研究要旨：**昨年度までに作成した人工ポリクローナルガンマグロブリンバッチに含まれるクローンが実際の生体分子と結合できることを、TNF $\alpha$ との結合を実証することができた。また結合試験に供した60クローン中2個が結合性を示し、ここで作成された人工ポリクローナルガンマグロブリンが生体調節因子に対するイディオタイプを比較的高率に含み、生体反応調節の役割を果たし得ることを示した。本研究班で開発された人工ガンマグロブリンはVL-VH複合体単量体であるが、生体分子との結合活性を生化学的に実証できたことは、人工ポリクローナルガンマグロブリンが製剤として生体内で機能することを示している。実際の製剤化に向けてはさらに高効率でクローニングできる発現系の開発と大規模のライブラリーバッチを作成する必要がある。今期の成果によって、前臨床試験に向けた大規模バッチのライブラリー作成が望まれる。

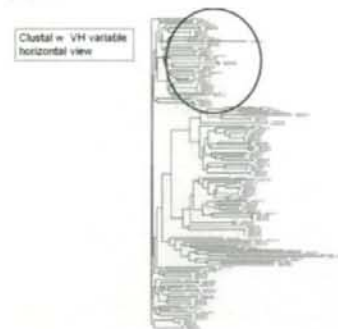
### A. 研究目的

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、マウスモデル系において血管炎における治療効果が本研究班の高橋らの分担研究により確認されている。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。昨年度までの分担研究で、精製のためヒスチジンタグを含むpoly-scFvと、ヒスチジンタ

グを含まない改良型のライブラリーより、その構成クローンを解析した結果、Hisタグ付加の初発ライブラリーの有効発現クローン比率28%、で有効クローン107個に重複はなかった。無Hisタグ改良型では有効クローンは768クローンの内151個で19.7%、と初発ライブラリーよりも有効クローン率が減少した。改良法ではVHをいったんクローニングしたのちにプラスミド増幅のステップが入るため、有効クローン151の中に36クローンの重複が確認され、結果ユニーククローンは786クローン中115クローンとなり有効クローン率は14.9%とさらに低下する結果となった。改良型のクローンより得られた塩基配列をもとにVH、VLそれぞれの可変領域



のクラスター解析を行い(図1)個々のクローンの類似関係を解析した。また抗体デ



ータベースとのホモロジー検索により、TNF $\alpha$ などのシグナル分子に対する抗体や pneumococcalなどの常在病原微生物に対する抗体クローンと類似のクローンを含んでいることを明らかにした(図2)。

図-2

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, Phi p 11-specific, IgM rheumatoid factor RF-MR27.
- 3B02 TNF- $\alpha$ , streptococcal/anti-myosin, glycoprotein VI, anti-rabies, Rh(D)
- 3A04 myosin-reactive, Rh(D), glycoprotein VI, HIV-1 gp120, tetanus toxoid, protoxin, mucin I 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 HEIs, Rhesus D, pneumococcal/anti-dsDNA
- 3I14 TNF- $\alpha$ , streptococcal/anti-myosin, tetanus toxoid.

ヒト抗体の生体内での多様性はイディオタイプとして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ィオタイプで10の8乗個から10乗個と推定されている。これら全てのイディ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。ここで人工ガン

マグロブリンのリソースとして使用しているの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ィオタイプクローンの集合と考えられる。今年度は前年度に作成した改良型人工ガンマグロブリンクローンの中に、実際に生体内で存在比が高いと考えられる抗TNF $\alpha$ 抗体と類似の機能、TNF $\alpha$ への結合能を有するクローンを含んでいるかを検討した。これによりこのライブラリーに含まれる抗体クローンが炎症制御等の生体反応制御に有効であるかを推測することが可能になり、より現実的な製剤としての人工ガンマグロブリンへ近づけることができる。

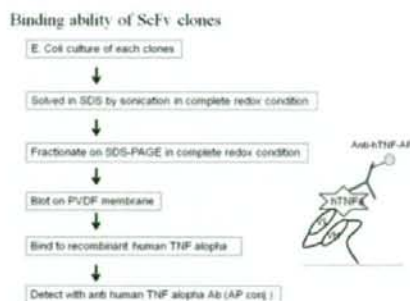
## B. 研究方法

改良型ライブラリーの任意のクローンとTNF $\alpha$ との結合活性の検討

昨年度構築した改良型ライブラリーに含まれるクローンのうち配列解析によって有効なグロブリンを生合成するクローンは115クローンであった。前年度の配列解析と抗体アミノ酸配列データベースとの比較解析から、TNF $\alpha$ 結合クローンと相同性が高いものが全体の5%程度と比較的多く含まれていたが、完全一致する配列をもつクローンは含まれていなかった。抗体の結合活性の8割方は重鎖の可変領域(VH)が担っていることから、VHの相同性のみに着目して相同性検索の結果を見たときに、TNF $\alpha$ 結合抗体クローンとの85%の相同性示すものが比較的高頻度で観察される。結合活性の予測は相同性解析からは行えないものの相同

性解析の結果を重視し、TNF $\alpha$ との結合活性を試行することで生体分子との結合能を評価することとした。セカンドバッチの115クローンの中から任意の60クローンを選抜し結合活性を検討した。各クローンを少量培養(約1ml)し菌体を収集し、還元状態(2メルカプトエタノール存在下)でイオン性界面活性剤を用いて超音波処理により細胞破砕し、菌体中のScFvタンパクを可溶化した。SDS-PAGEにより展開した後、PVDF膜に転写し固相化したScFvに対して、ヒトTNF $\alpha$ を結合させ、結合したTNF $\alpha$ をアルカリフォスファターゼ(AP)ラベル抗体により検出する。(図3)TNF $\alpha$ との結合はScFvの位置にバンドが検出できたときに結合活性があるものと評価した。

図-3



### C. 研究結果

本研究班で作成された人工ガンマグロブリンが生体内あるいは試験管内において、その効果を示すことは重要であり、実際の生体分子と結合能力をしますかどうかの評価もまた製剤としての効果を検証する上で重要なチェックポイントと考えられる。前年度までに作成されたポリクローナル人工ガンマグロブリンのバルクより分離したク

ローンを用いて実際の生体分子と結合能を示すかどうかの評価を行った。

前年度までの個々のクローンの配列解析より重鎖可変領域のアミノ酸配列と抗体アミノ酸配列データベースとの比較解析から、TNF $\alpha$ 結合クローンと85%程度の相同性を示すものが5%と比較的多く含まれていた。抗体データベースと完全一致する配列をもつクローンは含まれていなかったが、生体内で炎症反応を制御している分子としてTNF $\alpha$ は重要な分子であり、それとの結合活性を評価することは、ポリクローナル人工ガンマグロブリンの有効性を評価するための良い指標となると考えられる。抗体アミノ酸配列データベースとの比較解析からは、100%一致したクローンは得られていないが(図4)、配列相同性のみによっては結合



能を予測することはできないので、有効なScFvを産生できる115クローンからランダムに60クローンを選択し、完全還元状態で展開したのちウエスタンブロットによりPVDF膜上でのTNF $\alpha$ との結合活性を検出することを試みた(図3)。TNF $\alpha$ との結合は標準的なpHおよび塩濃度により行った。選択した60クローンの結果を図5に示す。

図-5

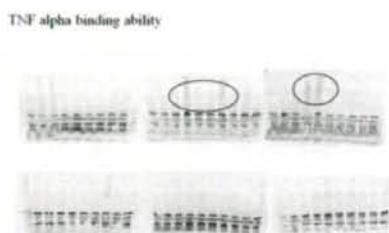
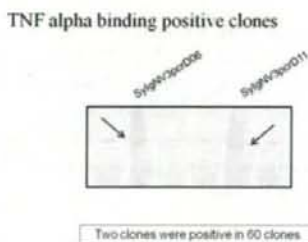


図-6



ScFv は VL-VH 複合体の単量体であり、天然の抗体クローンに比べその結合能は弱くなるものと予想され、検出されたとしても微弱なシグナルであろうことが予想される。図5では、60 クローンの中2種類のクローンにおいて TNF $\alpha$  との結合を示すと思われる ScFv のバンドを検出した (図6)。実際の生体分子と結合することが示したことは製剤としての人工ガンマグロブリンの効果を裏付ける結果であると考えられる。

#### D. 考案

本年度は班研究期間の最終年度にあたり、1、2年目で作成されたポリクローナル人工ガンマグロブリンの製剤化に向けて

必要とされる確かな性状を保證する意味においてバッチ内に含まれるクローンの多様性が保持されていることを確認し、また抗体アミノ酸配列データベースとの比較から、常在病原微生物に対するイディオタイプや生体内で様々な反応を制御するシグナル分子に対するイディオタイプを含んでいることを確認してきた。TNF $\alpha$  などの炎症性サイトカインやその他のシグナル分子に対するイディオタイプが健常者の体内で保持されていることは、これらのイディオタイプが炎症反応などの調節に関わっていることを示す証左でもある。本研究班の分担者、高橋、大野、宇野らによって生体内および試験管内でポリクローナル人工ガンマグロブリンの有効性を検証する結果が示されていることは、製剤としてのポリクローナル人工ガンマグロブリンにさらに近付いていると考えられる。

本分担研究においては、多様性の解析および配列解析から生体内で作用しているシグナル分子に対する抗体、とりわけ炎症性疾患の制御に関与している TNF $\alpha$  に対する抗体分子と相同性の高い可変領域を持つクローンが比較的頻度高く見出されたことから、実際に作成されたポリクローナル人工ガンマグロブリンに含まれるクローンが TNF $\alpha$  と結合するかを検証し 60 クローンの内2種のクローンが結合する結果を得た (図5、6)。昨年度行った抗体データベースと可変領域のアミノ酸配列相同性の結果から、抗 TNF $\alpha$  抗体と 85%程度の相同性を示すものが 5%程度含まれていたが、実際の結合活性の検証では 2/60 の 3%と同程度の割合を示している。解析を行ったクローン数がまだ少なく確定的ではないが、

1 種類の生体内シグナル分子である TNF $\alpha$  に対して 2/60 のクローンが結合性を示したことは、生体内で作用する自己の調節因子に対する抗体が比較的高率に存在していることを示していると考えられ、これらの自己抗体が炎症反応などの生体反応の調節に重要な役割を果たしていることを示す結果と考えられる。本研究班で作成されたポリクローナル人工ガンマグロブリンのバッチに実際に生体内調節因子に結合するクローンが含まれていることを実証できたことはポリクローナル人工ガンマグロブリンの製剤化に向けてさらに前進できたと考えられる。今期でクローニングから配列解析および整列化できたクローンはプライマリーバッチ、セカンダリーバッチ合わせて 200 クローン程度であり、生体内でのイディオタイプ多様性を考えたときに数百倍程度の整列化クローンバッチを整備することが望まれる。このためには高効率のライブラリー作成法の開発とクローン解析整列化の自動ライン化が必要である。製剤化に向けてさらに研究を進める必要があるものと思われる。

## E. 結論

人工ポリクローナルガンマグロブリンに含まれるクローンが実際の生体分子と結合できることを TNF $\alpha$  を指標として実証することができ、また 60 個中 2 クローンが結合性を示したことから生体調節因子に対するイディオタイプが比較的高率に含まれ生体反応調節に重要な役割を果たしていると思われる。本研究班で開発された人工ガンマグロブリンは VL-VH 複合体単量体であるが、そこに含まれるクローンが生体分子と結合

活性があり人工ポリクローナルガンマグロブリンが生体内で機能することを生化学的に実証できた。実際の製剤化に向けては高効率でクローニングできる発現系の開発とさらに規模の大きなクローンライブラリーを作成する必要がある。今期の成果によって、前臨床試験に向けた大規模バッチのライブラリー作成が望まれる。

## F. 健康危険情報

特記事項なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Osada N, Hashimoto K, Kameoka Y, Hirata M, Tanuma R, Uno Y, Inoue I, Hida M, Suzuki Y, Sugano S, Terao K, Kusuda J, Takahashi I. Large-scale analysis of Macaca fascicularis transcripts and inference of genetic divergence between *M. fascicularis* and *M. mulatta*. *BMC Genomics*. 2008 Feb 24;9:90.

### 2. 学会発表

1. 長田直樹、亀岡洋祐、平田誠、田沼玲子、鈴木穰、菅野純夫、高橋一朗 カニクイザル骨髄、脾臓、膵臓由来 cDNA ライブラリーの解析、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会、2008 年 12 月 神戸

2. 亀岡洋祐、古谷昌弘、大島正道、平田 誠、田沼玲子、長田直樹、高橋一朗、鈴木和男 人工ガンマグロブリンの多様性の検討、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会、2008 年 12 月 神戸

3. 亀岡洋祐、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活性制御に関与するか II MPO 研究会 2008 年 10 月 東京

## 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