

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—

研究分担者：長尾朋和 千葉大学大学院医学研究院 特任講師
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
研究分担者：山本健二 国立国際医療センター 国際臨床研究センター長
研究分担者：河内正治 国立国際医療センター 部長

研究協力：

流動研究員：常賀 千葉大学大学院医学研究院 流動研究員
研究分担者：大野尚仁 東京薬科大学 教授
研究分担者：宇野賀津子 ルイ・パストゥール医学研究センター 室長

研究要旨：マウス型に加え、ヒト型人工ガンマグロブリンのプロトタイプの前製に成功した。ヒト型人工ガンマグロブリンの体外評価法の開発のための *in vitro* での評価法を検討した。本分担では 18 年度では、Bio-Plex™ Cytokine Assays による網羅的解析法と QD-MPO 法による評価法を確立した。好中球活性化による MPO の細胞表面移行を QD-MPO (Qdot640 conjugated MPO antibody) と CD11b antibody で解析することで、IVIg 治療による効果を評価する方法を検討した。19 年度では、血管炎での IVIg 治療の有効性が活性化した血管内皮細胞の抑制にあると推定し、血管内皮細胞への IgG の作用を検討した。20 年度に継続し、IgG 添加による血管内皮細胞の傷害抑制作用を *in vitro* で解析した。TNF- α あるいは H₂O₂ によって活性化された血管内皮細胞に誘導される adhesion molecules(ICAM-1, VCAM-1, E-selectin)、IL-6, IFN- β , chemokines KC, MIP-2 の mRNA 発現を IgG が有意に抑制した。これらの結果から、IgG が活性化状態の血管内皮細胞の adhesion molecules、炎症 cytokines/chemokines の産生を抑制することが、IVIg 作用機転の一つと考えられる。以上から、3 年間の *in vitro* での評価法の検討により、人工ガンマグロブリンの体外評価法と作用機序解析への応用が可能となった。

A. 研究目的

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

利用できることを目的とした。

まず、anti-MPO 抗体が糸球体血管内皮細胞への作用、Bio-Plex™ Cytokine Assays による網羅的解析法と好中球活性化による MPO の細胞表面移行を QD-MPO (Qdot640 conjugated MPO antibody) と CD11b antibody で解析することで、IVIg 治療による効果を評価する方法を検討することを目的とした。さらに、好中球脱顆粒、活性酸素産生をはじめ

とする評価系を検討することも目的とした。

加えて、血管炎でのIVIg治療の有効性が、活性化した血管内皮細胞の抑制にあると推定し、培養血管内皮細胞へのIgG添加による傷害抑制作用を*in vitro*で解析することとした。具体的には、anti-MPO抗体、TNF- α あるいはH₂O₂で血管内皮細胞を刺激・活性化・傷害し、そのadhesion molecules、炎症性cytokines/chemokinesの発現とIgGによるその抑制作用を解析した。これにより、IgGによる活性化状態の血管内皮細胞のadhesion molecules、炎症cytokines/chemokinesの産生の抑制が、人工IgGおよびIVIgによる血管炎治療効果の評価指標となることを検討することを目的とした。

B. 研究方法

体外評価法として、以下の方法を導入した。

1) Bio-Plex™によるCytokines//Chemokines Assaysの測定

2) QD-MPO法による好中球のMPO細胞膜移行測定による好中球活性化指標の確立。IVIg治療による効果を好中球のMPOの細胞表面移行をQD-MPOおよびmouse anti-human monoclonal CD11b antibody, Molecular probes Hoechst 33258で染色・蛍光顕微鏡により判定した。

3) TNF- α およびH₂O₂によって誘導されるadhesion moleculesの発現へのIgG作用の解析:血管内皮細胞をTNF- α あるいはH₂O₂添加で刺激して活性化させ、E-selectin, VCAM-1, ICAM-1のmRNAの発現へIgGによる抑制効果を解析した。

4) TNF- α およびH₂O₂によって誘導されるadhesion moleculesの発現へのIgG作用の解析:IgG作用:血管内皮細胞をTNF- α あるいはH₂O₂添加で刺激して活性化させ、サイトカイン・ケモカインのmRNAの発現と産生へIgGによる抑制効果を解析した。

(倫理面での配慮)

本件は、培養細胞での解析につき、倫理上の問題は発生しなかった。

C. 研究結果

体外評価法として、以下の方法を導入できた。

1) Bio-Plex™によるCytokines//Chemokines Assaysの測定

IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , MCP-1(MCAF), MIP-1 β , TNF- α などのサイトカイン類を測定した。

2) QD-MPO法による好中球のMPO細胞膜移行測定による好中球活性化指標の確立。

IVIg治療による効果を好中球のMPOの細胞表面移行をQD-MPOおよびmouse anti-human monoclonal CD11b antibody, Molecular probes Hoechst 33258で染色・蛍光顕微鏡により判定した。

3) TNF- α およびH₂O₂によって誘導されるadhesion moleculesおよびサイトカイン、ケモカインの発現へのIgG作用の解析

TNF- α 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 β 、MIP-2、KC、MCP-1、IFN β 、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 β 、MIP-2、KC、IFN β 、IL-6は、IgG濃度依存的に強く抑制された(図1)。

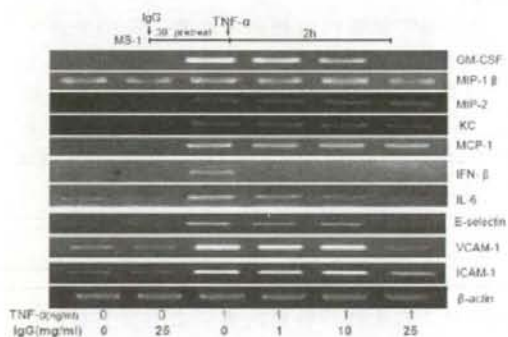


図1. IgGによるTNF- α 誘導のAdhesion molecules, cytokines/chemokinesの発現抑制

また、血管内皮細胞をH₂O₂添加で刺激して活性化させ、adhesion moleculesおよびサイトカイン・ケモカインのmRNAの発現を解析した。H₂O₂を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 β 、MIP-2、KC、MCP-1、IFN β 、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 β 、

MIP-2、KC、MCP-1、IFN β 、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 β 、IL-6 の発現の抑制は、顕著であった (図 2)。

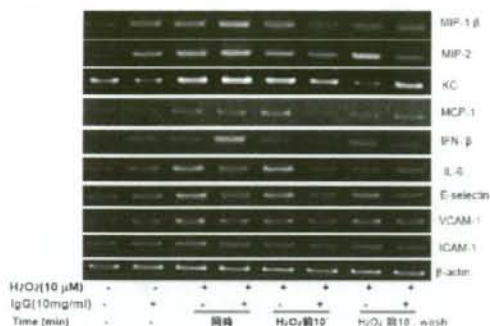


図 2. IgG による H₂O₂ によって誘導される adhesion molecules、サイトカイン、ケモカインの発現の抑制

4) 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

TNF- α 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 α 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- α あるいは H₂O₂ 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。

D. 考察

人工ガンマグロブリンの臨床応用に向け、*in vitro* での体外評価法を検討できた。

1) Bio-PlexTM による Cytokines//Chemokines Assays の測定法の検討、2) QD-MPO 法による好中球の MPO 細胞膜移行測定による好中球活性化指標の確立し、IVIg 治療による効果を好中球の MPO の細胞表面移行を QD-MPO により評価した。加えて、3) TNF- α および H₂O₂ によって誘導される adhesion molecules

の発現への IgG 作用の解析:血管内皮細胞を TNF- α あるいは H₂O₂ 添加で刺激して活性化させ、E-selectin, VCAM-1, ICAM-1 の mRNA の発現への IgG による抑制効果を解析した。さらに、4) サイトカイン・ケモカインの発現への IgG 作用の解析:血管内皮細胞を TNF- α あるいは H₂O₂ 添加で刺激して活性化させ、サイトカイン・ケモカインの mRNA の発現における IgG の抑制効果を解析した。

以上から、免疫グロブリンの *in vitro* での評価系を確立する方向が示された。特に、好中球活性化指標やサイトカイン測定法確立にむけて準備が整った。また、炎症の指標として、TNF- α や H₂O₂ 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ことが可能となった。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ことを期待できる。

E. 結論

体外評価法開発のための *in vitro* での評価法を検討し、anti-MPO 抗体が糸球体血管内皮細胞への作用、Bio-Plex 法による多項目のサイトカイン・ケモカインの評価系を検討できた。ついで、培養血管内皮細胞の傷害に対する IgG による抑制 (修復) 作用を *in vitro* で解析する方法を検討した。anti-MPO 抗体、TNF- α あるいは H₂O₂ で血管内皮細胞を刺激・活性化・傷害し、その adhesion molecules、炎症性 cytokines/chemokines の発現と IgG によるその抑制作用を解析した。TNF- α あるいは H₂O₂ によって誘導される adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1, E-selectin)、IL-6、IFN- β 、chemokines KC, MIP-2 の mRNA 発現は、IgG によって有意に抑制された。TNF- α および H₂O₂ 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 の作用の解析法としても利用できる可能性を示した。さらに、TNF- α 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。

これらの結果から、IgG が活性化状態の血管内皮細胞の adhesion molecules、炎症 cytokines/chemokines の産生の抑制は、IVIg による血管炎治療効果の評価指標となり、また、作用機転の一つと考えられる。本法により、*in vitro* でのガンマグロブリンの評価法と作

用機序の解析への応用が可能となった。

協力研究者

新井孝夫 (東京理科大学・教授)
古谷昌弘 (積水化学・水無瀬研・主任研究員)
三浦典子 (東京薬科大学・講師)
鈴木章一 (佐賀大学・助教)

論文 (英文) 発表

1. Y. Yasuda, T. Shimoda, K. Unoa, N. Tateishi, S. Furuya, K. Yagi, **K. Suzuki**, S. Fujita. The effects of MPTP on the activation of microglia/astrocytes and cytokine/chemokine levels in different mice strains. *J. Neuroimmunology*. in press.
2. T. Ito-Ihara, E. Muso, S. Kobayashi, K. Uno, N. Tamura, Y. Yamanishi, A. Fukatsu, R. A. Watts, D.G.I. Scott, D. R.W. Jayne, **K. Suzuki**, H. Hashimoto. A comparative study of the diagnostic accuracy of ELISA systems for the detection of anti-neutrophil cytoplasm antibodies available in Japan and Europe. *Clin. Exp. Rheumatol.* in press.
3. R. A. Watts, D.G.I. Scott, D.R.W. Jayne, T. Ito-Ihara, E. Muso, S. Fujimoto, Y. Harabuchi, S. Kobayashi, **K. Suzuki**, H. Hashimoto. Renal Vasculitis in Japan and UK – are there differences in epidemiology? *Nephrol. Dialysis Transplant.* 23(12):3928-3931, 2008.
4. S. Kobayashi, A. Ito, D. Okuzaki, H. Onda, N. Yabuta, I. Nagamori, **K. Suzuki**, H. Hashimoto and H. Nojima. Expression profiling of PBMC-based diagnostic gene markers isolated from vasculitis patients. *DNA Research* 15(4):253-265, 2008(Aug).
5. A. Mabuchi, T. Nagao, O. Koshio, T. Ishiwata, A. Yano, **K. Suzuki**, K. Yokomuro, A.M. Wheatley. Role of F4/80+Mac-1^{high} adherent non-parenchymal liver cells in concanavalin A-induced hepatic injury in mice. *Hepatology Res.* 38:1040-1049, 2008(Oct).
6. A. Hoshino, T. Nagao, N. Nagi-Miura, N. Ohno, M. Yasuhara, K. Yamamoto, T. Nakayama, **K. Suzuki**. MPO-ANCA induces IL-17 production by activated neutrophils in vitro via classical complement pathway-dependent manner. *J. Autoimmunity* 31:79-89, 2008.
7. Yasuda H, Yoshizawa N, Kimura M, Shigematsu M, Matsumoto M, Kawachi S, Oshima M, Yamamoto K, **Suzuki K**. Preparedness for the spread of influenza: prohibition of traffic, school closure, and vaccination of children in the commuter towns of Tokyo. *J Urban Health* 85(4):619-635, 2008.
8. Nguyen T. L., N. Nakajima, Phuc P., Y. Sato, Hoang N. T., Pham V.H., Luong T.S., H. Katano, T. Kumasaka, T. Oka, S. Kawachi, T. Matsushita, T. Sata, K. Kudo, **K. Suzuki**. H5N1-infected cells in lung with diffuse alveolar damage in exudative phase from a fatal case in Vietnam. *Jpn. J. of Infectious Dis.* 61: 157-160, 2008.
9. Y. Ogasawara, H. Kaya, G. Hiraoka, F. Yumoto, S. Kimura, Y. Kadota, H. Hishinuma, E. Senzaki, S. Yamagoe, K. Nagata, M. Nara, **K. Suzuki**, M. Tanokura, K. Kuchitsu. Synergistic Activation of Arabidopsis NADPH Oxidase AtrbohD by Ca²⁺ and Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 283:8885-8891, 2008.
10. Xiao G, Miyazato A, Inden K, Nakamura K, Shiratori K, Nakagawa K, Miyazawa T, **Suzuki K**, Kaku M, Kawakami K. *Cryptococcus neoformans* inhibits nitric oxide synthesis caused by CpG-oligodeoxynucleotide-stimulated macrophages in a fashion independent of capsular polysaccharides. *Microbiol Immunol.* 52:171-179, 2008.
11. Nakamura K, Miyazato A, Xiao G, Hatta M, Inden K, Aoyagi T, Shiratori K, Takeda K, Akira S, Saijo S, Iwakura Y, Adachi Y, Ohno N, **Suzuki K**, Fujita J, Kaku M, Kawakami K. Deoxynucleic acids from *Cryptococcus neoformans* activate myeloid dendritic cells via a TLR9-dependent pathway. *J Immunol.* 15:4067-1074, 2008..
12. K. Nakamura, K. Suzuki et al. Deoxynucleic acids from *Cryptococcus neoformans* activate myeloid dendritic cells via a TLR9-dependent pathway. *J. Immunol.*, 15:4067-1074, 2008.
13. K. Suzuki, S. Kobayashi, K. Yamazaki, M. Gondo, K. Tomizawa, Y. Arimura, K. Nakabayashi, S. Ozaki, M. Yoshida, T. Yoshida, N. Tsusaka, E. Muso, T. Okazaki, H. Hashimoto. Analysis of risk epitopes of anti-neutrophil antibody MPO-ANCA in vasculitis in Japan population. *Microbiol. Immunol.* 51: 1215-1220, 2007.
14. S. Uezono, Y. Sato, S. Hara, S. Hisanaga, K. Fukudome, S. Fujimoto, H. Nakao, K. Kitamura, S. Kobayashi, K. Suzuki, H. Hashimoto, H. Nuno. Outcome of ANCA-associated primary renal vasculitis in Miyazaki Prefecture. *Internal Medicine*, 46: 815-822, 2007.

15. M. Goedken, S. McComick, K.G. Leidal, K. Suzuki, Y. Kameoka, J.M. Astern, M. Huang, A. Cherkasov, W.M. Nauseef. Impact of two novel mutations on the structure and function of human myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.* 282:27994-8003, 2007.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. Shinohara Hiroyasu Nagai-Miura Noriko Ishibashi Ken-ichi, Adachi Yoshiyuki Akiko Ishida-Okawara, Toshiaki Oharaseki, Kei Takahashi, Shiro Naoe, **Kazuo Suzuki**, and Naohito Ohno. Beta-mannosyl linkages negatively regulate anaphylaxis and vasculitis in mice, induced by CAWS, fungal PAMPs composed of mannoprotein-beta-glucan complex secreted by *Candida albicans*. *Biol. Pharm. Bull.* 29: 1854-1861, 2006.
20. Shouichi Fujimoto, Shigehiro Uezono, Shuichi Hisanaga, Keiichi Fukudome, Shigeto Kobayashi, **Kazuo Suzuki**, Hiroshi Hashimoto, Hiroyuki Nakao, Hiroyuki Nuno. Incidence of ANCA-associated primary renal vasculitis in Miyazaki Prefecture: The first population-based, retrospective epidemiological survey in Japan. *Clinical Journal of American Society of Nephrology.* 1: 1016-1022, 2006.
21. Yasuaki Aratani, Fumiaki Kura, Haruo Watanabe, Hisayoshi Akagawa, Yukie Takano, Akiko Ishida-Okawara, **Kazuo Suzuki**, Nobuyo Maeda, and Hideki Koyama. Contribution of the myeloperoxidase-dependent oxidative system to host defense against *Cryptococcus neoformans*. *J. Med. Microbiol.* 55: 1291-1299, 2006.
22. A. S. Persad, Y. Kameoka, S. Kanda, Y. Niho, **K. Suzuki**. Arginine to Cysteine Mutation (R499C) Found in a Japanese Patient with Complete Myeloperoxidase Deficiency. *Gene Expression* 13: 67-71, 2006.
23. N. Nagai-Miura, T. Harada, H. Shinohara, K. Kurihara, Y. Adachi, A. Ishida-Okawara, T. Oharaseki, K. Takahashi, S., Naoe, **K. Suzuki** and N. Ohno. Lethal and severe coronary arteritis in DBA/2 mice induced by fungal Pathogen, CAWS, *Candida albicans* water-soluble fraction. *Atherosclerosis* 186: 310-320, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

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：本分担研究においては、第 1 期及び第 2 期人エガンマグロブリン研究班の研究により開発された人エポリクローナルガンマグロブリンの多様性を検証し、内包するクローンの解析から抗体調節分子抗体が成熟した生体の中で保持されていることを示した。また、ここで開発された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 α を指標として実証することができた。本研究班で開発された人工ガンマグロブリンを製剤化するにあたり、さらに配列が特定された規模の大きなクローンライブラリーを構築することにより、多様な疾患に対応するクローンの組み合わせを可変とするセミポリクローナルグロブリンのアイデアも生まれた。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 期人エガンマグロブリン研究班の研究により開発された人エポリクローナルガンマグロブリンの有効性はこの研究班の他の分担研究によって明らかになりつつある。マウス型およびヒト型人エポリクローナルガンマグロブリンの双方を用いて、マウスモデル系での血管炎の治療効果が確認されつつある。これまでの検討から、抗体分子内の可変領域である scFv を用いると治療効果があり、Fc 領域を用いても効果がみられないことから、scFv における多様性が治療効果を上げるために重要であることが推察されている。本分担研究で

は積水化学の古谷らによって作成されたヒト型 Poly-scFv バッチに含まれる一部のクローンについて発現プラスミドに挿入されたガンマグロブリン VL-VH 部分の塩基配列を解析することによって、抗体分子の多様性が保たれているかを検討する。この検討からバッチ内で有効発現クローンの比率が求められ、製剤化に必要な効率のよい発現クローンバッチ作成の評価を行うことができる。また、製剤化のためには発現クローンバッチを連続的に増幅する必要があり、この増幅過程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なければならない点も重要な問題であり、製剤化のために安定したリソースとしての親ライブ

ラリー構築の評価ともなる。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。使用している RNA のリソースは健康成人末梢血から得ているので、ある程度成熟度の高い B 細胞クローンの集合であり、H 鎖、L 鎖ともに再構成が終了した後のクローンと考えられる。したがって、体内で有効な抗体を産生するイディオタイプクローンの集合とも考えられる。古谷らによって作成されたヒト型 Poly-scFv のバルクは 10 の 8 乗個程度のクローンを含んでおり、この中でも有効に機能するイディオタイプはその一部と考えられることから、人工抗体クローンバッチに含まれる個々のクローンの整列化を視野に入れつつ、プライマリーバッチ、およびヒスチジンタグを除いた改良型であるセカンダリーバッチのクローンの塩基配列解析を行い有効クローンの比率およびその多様性の保持について評価を行うことを目的とした。また最終年度には有効クローンの配列解析から生体調節分子に対する抗体種が多数含まれることから、実際に生体内で存在比が高いと考えられる抗 TNF α 抗体と類似の機能、TNF α 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

近づけることが本分担研究の目的である。

B. 研究方法

分担研究者古谷らが作成したヒト型 scFv 発現クローンプライマリーライブラリーより 384 個、改良型セカンダリーバッチは 1152 個をピックアップして整列化、プラスミドを得たうえで、VL-VH のインサート部分の塩基配列を行った。解析結果はデータベース化し VL、VH のそれぞれの定常領域と可変領域に分けてアミノ酸配列の形で比較検討できるように構築した。内包するクローンの多様性に関する検討を行うため、VL、VH のそれぞれの可変領域のアミノ酸配列をもちいて clustalW によってクラスタ解析を行い、重複性の有無を評価した。改良型セカンダリーバッチにおいては、クローニングの際に VL を先にクローニングし 1 次増殖の後、VH フラグメントの挿入を行う方法をとった。塩基配列は順方向、逆方向の双方から解析し正確を期した。

最終年度では、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、相同性検索の結果を見たときに、自己の生体分子に対するクローンが比較的高頻度で観察されることから、TNF α 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。各クローンから ScFv タンパクを得て、還元状態 (2メルカプトエタノール存在下) 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 α を結合させ、結合した TNF α 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。TNF α 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。

C. 研究結果

プライマリーバッチおよび改良型のセカンダリーバッチの配列解析結果のまとめを表 1 に示した。プライマリーバッチの有効クローンは 107/384 で 28% であるのに対してセカンダリーバッチでは 151/768 と 19% にやや低下した。

表 1

Comparison of the primary and the secondary library

| Category | | primary | primary (%) | secondary | secondary (%) |
|-------------------|-----------------|---------|-------------|-----------|---------------|
| Full insert (182) | With stop codon | 85 | 22.1 | 151 | 19.7 |
| | No stop codon | 107 | 27.9 | 151 | 19.7 |
| Half fragment | | 56 | 14.6 | | |
| Other insert | | 10 | 2.6 | | |
| Empty plasmid | | 105 | 27.3 | 94 | 12.2 |
| NG | | 21 | 5.5 | 283 | 36.8 |
| No plasmid | | | | 89 | 11.6 |
| Sum | | 384 | | 768 | |

プライマリーバッチの有効クローン 107 個の配列を比較解析ではクローンの重複は見いだされなかったが、セカンダリーバッチでは 151 クローンの内、VH 可変領域の比較で重複が起きているクローンは 16 個であると判断され、拾い上げ時のミスによるも

のが 16 個であり、ライブラリーに含まれる

図 1

Estimation of unique clones in 151 complete

| | | |
|--|----------|----------|
| Redundant clones at picking artifact | 2 clones | 12 times |
| | 3 clones | 4 times |
| Redundant in the sub-library | 2 clones | 16 times |
| Minus from 151 complete | | |
| Number of Unique clone | | |
| 151 - 12 - 2x4 - 16 = 115 (76% in 151) | | |

イデオタイプ種類数としては、115 種類であった。(図 1) VL の可変領域についても同様のクローン間でのホモロジー解析を行ったところ、多数の重複クローンを含んでいることが判明した。これはクローニング時に VL を先行してクローニングし増幅しているためであると考えられ、更なる方法の改良が必要である。図 2 にはアミノ酸配列で 85% 以上のホモロジーを示しかつ、相手方のアノテーションが明確であったものを列挙した。

図 2

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

| | |
|------|--|
| 2K15 | TNF- α , streptococcal anti-myosin, Rh(D), alpha-synuclein rabies virus, Phi p 11-specific, IgM rheumatoid factor RF-MR27. |
| 3B02 | TNF- α , streptococcal anti-myosin, glycoprotein VI, anti-rabies, Rh(D) |
| 3A04 | myosin-reactive, Rh(D), glycoprotein VI, HIV-1 gp120, tetanus toxoid crotoxin, mucin I heavy chain, anthrax monoclonal antibody F3-6 |
| 3O22 | TNF- α , alpha-synuclein intrabody, Rh(D), rabies virus |
| 3E11 | TNF- α , streptococcal anti-myosin. |
| 2A02 | streptococcal anti-myosin, <i>Listeria monocytogenes</i> . |
| 2A01 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , Rh(D), pneumococcal |
| 3G05 | HBs, <i>Rhesus D</i> , pneumococcal anti-dsDNA |
| 3I14 | TNF- α , streptococcal anti-myosin, tetanus toxoid. |

最も高頻度に見られたのは TNF α に対するイディオタイプで TNF α 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。その他の生体内シグナル因子も加えると自己の因子に対する抗体が高頻度に含まれていることが判明した。VH の 59 アミノ酸残基のうちさらに限られた数残基によりイディオタイプ特異性を決めているものと思われ、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生体内反応調節に関わっていることが予想される。TNF α は炎症反応制御に重要な分子であり、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 α との結合活性を検出することを試みた。TNF α 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 3 に示す。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 3 では、60 クローンの中 2 種類のクローンにおいて TNF α との結合を示すと思われる ScFv のバンドを検出した (図 4)。実際の生体分子と結合することが示したことは製剤と

図 3

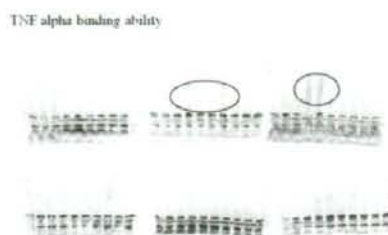
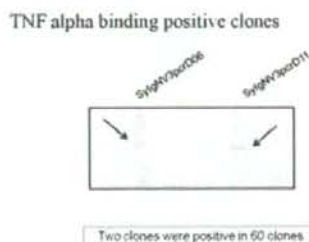


図 4



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

本研究班の 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証する意味においてパ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。

生体内における抗体のイディオタイプは

10 の 10 乗個以上の種類ができることが論理的に示されているが、実際の成熟した生体内で機能している抗体のイデオタイプは限られたものであるとの指摘もある。人工ポリクローナルガンマグロブリンを構成する際に限られたイデオタイプによるセミポリクローナルという考え方が示唆され、数千種類程度のイデオタイプの組み合わせによる効果的なグロブリン集団を作れる可能性が示され、この方法が人工ポリクローナルガンマグロブリン製剤化に有効かつ現実的な手段であると考えられた。このセミポリクローナルガンマグロブリンを構成するため、整列化クローンバッチ作成は重要であり、有効クローン率の高いライブラリー構成も必須である。また含まれる抗体クローンの配列を明確化することで将来的に適用するクローンの取捨選択を可能にしておくことは、さまざまな症例への適応を可能にすると考えられる。

有効クローンとデータベース比較解析から、ライブラリーのイデオタイプには TNF α などの炎症性サイトカインに対するイデオタイプや病原性微生物に対するイデオタイプが含まれていることが判明し、生体機能の調節や常在する病原性微生物に対抗できる可能性を分子レベルでも確認することができた。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、一例として TNF α に対する抗体分子と同一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、TNF α と実際に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 XX)。抗 TNF α 抗体と同一性を示すものが数パーセント含まれており、

実際の結合活性検証でも 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 α 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へと近づけるものであると思われる。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まだ少数だが、生体内でのイデ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は可能であり、その作成が強く望まれるところである。

E. 結論

本研究班で作成された人工ガンマグロブリンライブラリーを構成するクローンの多様性が保持されていることを検証した。本研究の中から、製剤化を現実のものとする限られたクローンの集合によるセミポリクローナルという考え方が示されたことは大きな前進であったと考えられる。また、生体内のイデオタイプに自己の調節因子に対する抗体が比較的高い頻度で含まれることを示し、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 α を指標として実証することができた。このような生体調節因子に対するイディオタイプが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を製剤化するためには、さらに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パ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

1. Persad AS, Kameoka Y, Kanda S, Niho Y, Suzuki K, Arginine to cysteine mutation(R499C) found in a Japanese patient with complete myeloperoxidase deficiency. *Gene Expr* 13:67-71, 2006.

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

3. Rangsiuji A, Sugiyama H, Morishima Y, Kameoka Y, Donsakul T, Binchai S, Ketudat P. A new record of *Paragonimus* other than *P. westermani* in southern Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2006;37 Suppl 3:57-61.

4. 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. Yosuke Kameoka, Tsuyoshi Kasama, Toshiko Ito-Ihara, Eri Muso and Kazuo Suzuki. A polymorphism on the leader peptide of myeloperoxidase and inflammatory disease. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and

11th FAOBBM Congress, 2006年6月、京都

2. 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、第12回MPO研究会、2006年9月、大阪

3. 亀岡洋祐、高橋一郎、長田直樹、田沼玲子、平田誠、楠田潤、カニクイザル cDNA マイクロアレイの作製と評価、日本分子生物学会 2006 フォーラム、2006年12月、名古屋

4. 亀岡洋祐、長田直樹、田沼玲子、平田誠、高橋一郎、笠間毅、鈴木哲朗、猪原登志子、武曾恵理、楠田潤、橋本雄之、鈴木和男、MPO リーダーペプチドは好中球顆粒に局在する、第30回日本分子生物学会年会、2007年12月 横浜

5. 長田直樹、橋本雄之、楠田潤、亀岡洋祐、田沼玲子、平田誠、高橋一郎、カニクイザル cDNA ライブラリーコレクションの拡充とその解析、第30回日本分子生物学会年会、2007年12月 横浜

6. 亀岡洋祐、笠間毅、鈴木哲朗、猪原登志子、武曾恵理、橋本雄之、鈴木和男、MPO リーダーペプチドは MPO 活性制御に関与するか、第13回MPO研究会、2007年10月、広島

7. 亀岡洋祐、笠間毅、鈴木哲朗、猪原登志子、武曾恵理、橋本雄之、鈴木和男 MPO リーダーペプチドは好中球顆粒に局在する、「炎症制御治療フォーラム千葉-2007」、2007年7月、千葉

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

9. 長田直樹、亀岡洋祐、平田誠、田沼玲子、鈴木穰、菅野純夫、高橋一郎 カニクイザル骨髄、脾臓、脾臓由来 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

10. 亀岡洋祐、古谷昌弘、大島正道、平田 誠、田沼玲子、長田直樹、高橋一郎、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

11. 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

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

研究分担者 野島 博 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨：高用量ヒト免疫グロブリン静注療法（IVIG）は川崎病などの自己免疫疾患に対する有効な治療のひとつである。本研究では、その仕組みを理解する手段のひとつとして、自己免疫疾患の血液細胞で特異的に転写誘導（抑制）されている遺伝子群を包括的に単離し、それらを貼り付けた選抜アレイを(focused microarray)作製して低侵襲な血液 RNA 診断法として開発してきた。そのために、血管炎症候群（高安病、MPA、CSS など）、全身性エリテマトーデス(SLE)、慢性関節リウマチ、自己免疫性血小板減少性紫斑病（ITP）などの患者血液細胞（白血球）において共通に転写誘導（抑制）される遺伝子群を単離した。これらのうち約 200 遺伝子を三菱レイヨン（株）のジェノパールに搭載することで「不明熱・膠原病診断チップ」を作製し、それが測定繰り返し誤差は 1%以下、アレイ間の誤差は 3%以下という優れた製品であることを証明した。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 GOS2 遺伝子について詳細な機能解析を進め、抗 GOS2 抗体が血液細胞抽出液をサンプルとした新たな診断マーカーとして有用である可能性を示唆する結果を得た。本研究の示す新たな方向は、IVIG 治療法の発展と難治性血管炎を含む自己免疫疾患の診断に大きく役立つ可能性があることと示唆された。

A. 研究目的

自己免疫疾患患者の血液細胞で転写誘導（抑制）されている遺伝子群を包括的に単離し、疾患発症に深く関わっている遺伝子を見出して解析することで、IVIG 治療の有効性の仕組みを解明することを目的とする。さらに単離した遺伝子の転写レベルを個々の患者で調べることによって病態との関連付けを行うことも目的とする。また選抜アレイして実用化することで、確定診断の難しい血管炎において、それらの発現パターンを診断のマーカーとして用いる可能性も探る。

B. 研究方法

独自に開発した段階的サブトラクション法(多段差引法)と DNA チップ解析(Agilent, Hu44K)を用いて、難治性血管炎を含む自己免疫疾患患者の末梢血液細胞で転写誘導（抑制）されている遺伝子群を単離・同定した。これらを三菱レイヨン（株）のジェノパールに搭載して「不明熱・膠原病診断チップ」の試作品を作製し、それを最適に運転できる実験条件を設定して運用する。

対象とした自己免疫疾患を以下に列挙する：慢性関節リウマチ(RA)、全身性エリテマトーデス(SLE)、自己免疫性血小板減少性紫斑病（ITP）、顕微鏡的多発血管炎(MPA)、高安動脈炎(TA)、ウエゲナー肉芽腫症

(WG)、抗リン脂質抗体症候群(APS)、アレルギー性肉芽腫血管炎(AGA)、悪性関節リウマチ(MRA)、側頭動脈炎(GCA)、バージェー病(BD)、結節性多発動脈炎(PN)。

(倫理面への配慮)

部局で倫理委員会の承認を受けるとともに、健常人および患者の血液採取は全て書面によるインフォームド・コンセントをとることで倫理面に配慮した。本研究計画では遺伝子の発現量を検索するだけで塩基配列の違いを比較する訳ではないので、いわゆるゲノム倫理面の問題はないと考えられ、実際にゲノム倫理委員会でもそのような判断がなされたが、念のため規則に準じた扱いをした。また、これとは別に阪大の「ヒトゲノム研究審査」を申請して許可を得た。

C. 研究結果

まず、この性能比較のために別途作製した、「感染症チップ」の試作品について、短い時間内で測定する際の検出下限濃度を決定した。次いで測定誤差の詳細な検証を進めた。まず行ったのはジェノパールシステム(とくに測定機器)の持つ、避けられない自然発生的な誤差がどの程度であるかの検証である。そのために、ひとつのアレイに対して連続して4回測定し、測定結果にどの程度の誤差が生じるかを観察した。この時に並行して行った実験はアレイ間の誤差についての検証である。この目的のために、一度に4枚のアレイを使い、同時に調製した同じプローブセット(感染症40種類)をハイブリダイズさせた。それらについて、前述のように連続して4回測定し、測定結果にどの程度の誤差が生じるかを観察した。

こうして得た合計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。

「不明熱・膠原病診断チップ」に対しても同様のテストを行って再現性を検証した。具体的には健常人や患者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、4回連続に測定した値の間の誤差が極めて低い事を証明できた。

次に今後の全ての診断データの基準となる健常人群におけるジェノパールの測定値を正確に求め対角ドット表示をした(図1)。

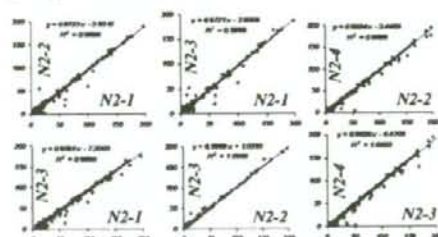


図1: 不明熱・膠原病診断チップ測定誤差の検証結果の対角ドット表示。対角線から離れる遺伝子ドットが少ない事と R^2 値が1.0に近い事は、再現性が良い(測定誤差が少ない)ことを意味する

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

ブ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 (図 2)。すなわち赤枠、青枠、紫枠で囲んだ 4, 4, 2 遺伝子について 12 人全員、11 人、10 人で、顕著に発現亢進していた。これらの遺伝子はいずれも我々が今回初めて同定した新規遺伝子である。今回の患者は全く新規な患者であることを考えると、この結果は不明熱・膠原病診断チップが診断に有用のみでなく、血管炎の遺伝子マーカーの発見にも役立つ事を示唆する。

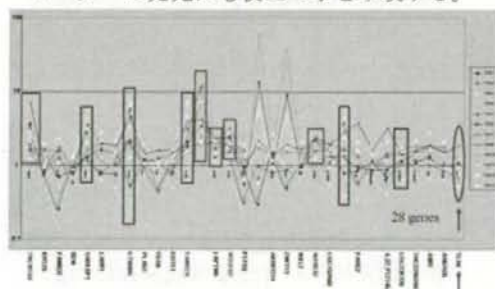


図 2 : 12 名の高安病血管炎の患者に対する不明熱・膠原病診断チップ検査の結果。赤枠で囲んだ遺伝子が発現亢進していればある不明熱患者が高い確率で高安病血管炎であると診断できるかもしれない。

次いで不明熱・膠原病診断チップに搭載してある遺伝子の発現解析を進めた。すなわち、SLE と ITP に関する遺伝子についてリアルタイム PCR を使って、健康人、個々の患者における発現量を比較検索したところ SLE や ITP において以下に列挙する 8 個の遺伝子が浮かび上がってきた ; interferon (IFN)- α -inducible protein 27 (*IFI27*), IFN- α -inducible protein IFI-15K (*GIP2*), IFN stimulated gene 20kDa (*ISG20*), epithelial stromal interaction 1 (*EPSTI1*), defensin- α (*DEFA3*), amphiregulin (*AREG*), *AL050290*,

AY358224 (= *SLED1*)。このうち、*IFI27*, *GIP2*, *SLED1* は SLE 患者でのみ発現亢進していた。一方、*AREG*, *AL050290* は SLE 患者で少しだけ、ITP 患では一層高く発現亢進していた。さらに *defensin- α* , *GIP2*, *EPSTI1* は SLE および ITP 患者両方で過剰発現していた。これらのうちいくつかはインターフェロン応答性であり、*defensin- α* の発現亢進とあわせ考えると感染体に対する免疫応答が働いている可能性が示唆された。患者の臨床所見とこれら遺伝子の発現量を比較したところ、*ISG20*, *EPSTI1*, *SLED1* は白血球数の異常と関連していた。

一方、不明熱の症状を起すことのある小血管壊死性血管炎であるチャグ・ストラウス症候群 (Churg-Strauss Syndrome: CSS) 別名アレルギー性肉芽腫性血管炎 (AGA) という自己免疫疾患患者 (受診時に症状が鎮静化していた患者も含む 7 例) の血液から抽出した PBMCs 由来の RNA を用いた選抜アレイ解析を行った。その結果、すでに前回でもその一部を簡単に報告したように、微生物 (とくに細菌) の感染後にマクロファージなどによる免疫反応を介した分解防御が起こった形跡と考えられる PREP135 (coactosin 様タンパク質)、PREP77 (プロサボシン)、PREP191 (カテプシン D)、PRPE234 (c-fgr)、および PREP136 (リゾチーム) の発現亢進を 7 例の CSS 患者すべてにおいて見出した。別の 28 遺伝子 (これらの幾つかは免疫応答や炎症関連遺伝子) も緩やかながら発現が亢進していた。一方、3 遺伝子については、すべての CSS 患者で発現の減少が見られた。これらの遺伝子発現の上昇、あるいは減少の特徴は、患者の免疫システムが微生物の侵入に対応して活

性化していることを示唆している。

ジェノバ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。G0S2 は細胞周期の静止 (G0) 期にある免疫細胞に増殖刺激を与えて複製(S)期に導入した際に転写誘導される遺伝子のひとつである。その機能を調べるためアクチンプロモーターを付けて過剰発現させたトランスジェニックマウス(G0S-TG)を作製して調べたところ、このマウスは生まれるものの病弱で、メスは妊娠しにくいだけでなく流産しやすかった。生き延びた大人マウスも組織内に微小膿瘍(microabscess)に類似の病変が見られ、血清内には好核抗体や抗 DNA 抗体の値が上昇するなど、たとえば SLE などに見られる自己免疫疾患様の病態を示した (図 3)。

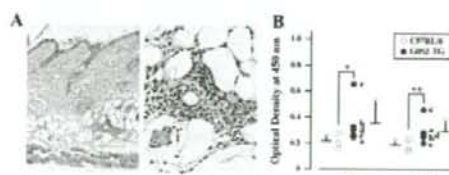


図 3 : G0S2-TG の示す異常。(A) G0S-TG の皮膚や皮下脂肪層に微小膿瘍に類似の病変 (枠内: 右はその拡大図) が見られた。(B) G0S-TG の血清は健常マウス (C57BL/6) に比べて好核抗体や抗 DNA 抗体の値が上昇していた。

G0S2 の機能を調べるための道具として、G0S2 に対するモノクローナル抗体とポリクローナル抗体を作製した。これらは、*in vitro* (TNT システムを使用) で生合成した Myc タグをつけた G0S2 タンパク質 (6Myc-G0S2) を市販の Myc 抗体と同程度かそれ以上の感度で特異的に認識したのみでなく、2 種類のモノクローナル抗体 (#2-15, #3-1)

は細胞あるいは組織の免疫染色においても有用である事を証明できた。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診断マーカーとして有用である可能性を示唆する。

D. 考察

不明熱 (FUO: fever of unknown origin) は「 $38 \cdot 3^{\circ}\text{C}$ 以上の発熱が 3 週間以上続き、1 週間検査しても診断のつかない発熱」と定義される原因不明の発熱症である (Petersdorf and Beeson, 1961)。約 70% は精密な検査により感染症、非感染性炎症性疾患(膠原病や血管炎症候群)、悪性腫瘍のいずれかに原因が特定されるが、約 30% は診断が未定に終わる。不明熱の診断を確かなものにするため、我々が今回作製した選抜アレイは末梢血液を資料とした不明熱を迅速・簡便に診断できる低侵襲な診断法として展開できる可能性を持つことを証明できた。

E. 結論

ここで単離・同定した遺伝子群は今後の自己免疫疾患とくに血管炎の確定診断用遺伝子マーカーの探索と自己免疫疾患発症機序の遺伝子レベルでの研究の足がかりとして役立つことが示唆される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Nakamura N, Shimaoka Y, Tougan T, Onda H, Okuzaki D, Zhao H, Fujimori A,

- Yabuta N, Nagamori I, Tanigawa A, Sato J, Oda T, Hayashida K, Suzuki R, Yukioka M, Nojima H, Ochi T. Isolation and expression profiling of genes upregulated in bone marrow-derived mononuclear cells of rheumatoid arthritis patients. *DNA Res.*, 13(4):169-183, 2006.
- (2) Tougan T, Onda H, Okuzaki D, Kobayashi S, Hashimoto H, Nojima H. Focused microarray analysis of peripheral mononuclear blood cells from Churg-Strauss syndrome patients. *DNA Res.*, 15(2):103-114, 2008.
- (3) Kobayashi S, Ito A, Okuzaki D, Onda H, Yabuta N, Nagamori I, Suzuki K, Hashimoto H, Nojima H. Expression profiling of PBMC-based diagnostic gene markers isolated from vasculitis patients. *DNA Res.*, 253-265, 2008.
- (4) Tougan T, Okuzaki D, Nojima H. Chum-RNA allows preparation of a high-quality cDNA library from a single-cell quantity of mRNA without PCR amplification. *Nuc. Acids Res.*, 36(15):e92, 2008.
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）**
1. 特許出願
- (1) 血管炎（angiitis）患者の血液細胞特異的遺伝子群（特願 2005-161681）【発明者】野島 博、恩田弘明、橋本博史、小林茂人、鈴木和男【出願者】科学技術振興機構、大阪大学知財部【出願日】平成 17 年 6 月 1 日
- (2) 自己免疫性血小板減少性紫斑病（ITP）患者の血液細胞特異的遺伝子群（特願2005-306409）【発明者】野島 博、恩田弘明、富山佳昭【出願者】科学技術振興機構、大阪大学知財部 【出願日】平成17年9月30日
- (3) 微量 mRNA の増幅方法およびその利用（特願2006-246053）【発明者】野島博、東岸任弘、奥崎大介【出願者】大阪大学知的財産本部【出願日】2006年（平成18年）9月11日
【国際特許出願番号】 PCT/JP2007-066808、【国際特許公開番号】 WO2008/032574、【国際特許出願日】2007 年（平成 19 年）8 月 29 日
- (4) 慢性関節リウマチに罹患したヒト由来の骨髓又は末梢血細胞で特異的に発現亢進している遺伝子群（特願 2006-274629）【発明者】野島博、越智隆弘【出願者】大阪大学知的財産本部【出願日】2006 年(平成 18 年)10 月 6 日
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

インターフェロン・サイトカインシステムからみた MPO-ANCA 血管炎患者の特性：
IVIg 療法の作用機序解明の為の基礎的研究

研究分担者 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室長
（研究協力者 武曾恵理、猪原登志子（財）田附興風会北野病院医学研究所）

研究要旨：IVIg 療法が有効であることが報告されている、MPO-ANCA 血管炎患者の特性を明らかにするために、患者のインターフェロン・サイトカインシステムの指標となる免疫パラメーターについて、IgA 腎症と比較しつつ検証した。末梢血の IFN- α 産生能、プラズマサイトイド樹状細胞数(pDC)を測定したところ、健常人、IgA 腎症患者に比較していずれも有意に低下していた。このような MPO-ANCA 血管炎における IFN システム不全の更なる検討は、この病気の病因解明に重要な情報をもたらすと思われる。さらに末梢血血漿中のサイトカイン・ケモカインを Multi plex システムにて測定したところ、治療前の MPO-ANCA 腎炎患者では、測定できた 26 項目のサイトカイン・ケモカインのうち、IL-1 β , 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- γ , IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1b, PDGF-bb, VEGF の 20 項目が健常人の値に比較して有意に上昇していた。一方、IgA 腎症患者では、IL-9, IL-17, PDGF-bb は健常人に比較して上昇、他のサイトカイン・ケモカインは健常人と同レベルであった。このように多くのサイトカインが血中で上昇している MPO-ANCA 腎炎にたいし、*in vitro* 実験系にて IVIg 添加は多様なサイトカイン産生抑制効果を示すことから、患者への IVIg 療法の有効性の作用機作の一つとしてサイトカイン産生抑制が推察された。

A. 研究目的

MPO-ANCA 血管炎の治療法として大量 γ -グロブリン(IVIg)療法に期待がもたれている。MPO-ANCA 血管炎のインターフェロン(IFN)システムおよびサイトカイン動態の特性を検討し、IVIg の採用機作を明らかにすることは、この治療法のさらなる発展に必須である。そこで、MPO-ANCA 血管炎の病態特性を同じ腎疾患である IgA 腎症と比較しつつ検討した。併せてこれらの特性を考慮にいられた、*in vitro* の系での人工ガンマグロブ

リン評価の系樹立を目指した。

B. 研究方法

B-1、MPO-ANCA血管炎患者のIFN- α 産生能とプラズマサイトイド樹状細胞(pDC)数の測定

健常人、IgA腎症、MPO-ANCA血管炎患者の末梢血をヘパリン採血し、全血のままセンダイウイルス(HVJ)500HA/mlにて刺激、20時間後に遠心、上清中のIFN活性をバイオアッセイにて測定した。同時にpDC数およびmDC数を測定した。pDCはBDCA-2⁺、

Lin⁻(CD3⁻, CD19⁻, CD14⁻), HLA-DR⁺, mDCはCD11c⁺, Lin⁻(CD3⁻, CD19⁻, CD14⁻), HLA-DR^{hi}と定義した。pDCの染色はヘパリン加採血した末梢血全血をlysing solutionにてlysisし、その後、BDCA-2⁺, HLA-DR⁺, Lin⁻細胞を染色した。mDCの染色には、CD11cは全血のまま染色し、その後lysing solutionにてlysisしその後、HLA-DR⁺, Lin⁻細胞を染色した。1mlあたりの細胞数は以下の式で求めた。

$$\text{No. of pDC (mDC)/ml} = \text{No. of WBC/ml} \times \text{pDC (mDC)\%/100}$$

B-2、血漿中サイトカイン動態の測定

人間ドックの結果を基に、選択した健常人(糖尿病、感染症、肝炎、腎症、自己免疫疾患は除く、n=48)と、北野病院でMPO-ANCA腎炎と診断されたの治療前患者(n=28)、IgA腎症患者(治療前&治療中n=26)の血漿中サイトカイン・ケモカインレベルをBioplex 27plex array (IL-1β, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17, TNF-α, Eotaxin, FGFbasic, G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, IP-10, MCP-1, MIP-1α, MIP-1b, PDGF-bb, RANTES, VEGF について測定し比較した。

B-3、全血法によるサイトカイン産生能のIVIgの影響の検討

健常人および、患者から静脈血をヘパリン採血した。より簡単な評価系で、さらには、IVIgの効果が期待できる人と期待できない人の峻別にも利用できる可能性を考え、全血を用いて、測定する系を作製した。即ち採取した血液をそのままイーグル MEM にて、4倍に希釈し、その後、25 μg/ml の PHA を添加 96 穴皿に移して、更に、0.01-10mg/ml の人工γグロブリンを添加、20時間後上清を回収した。

上清中のサイトカイン濃度は、Bio-plex Th1/Th2 array (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12p70, IL-13, TNF-α, GM-CSF, IFN-γ)を用いて測定した。

C. 研究結果

C-1. MPO-ANCA 血管炎患者, IgA 腎症患者の IFN 産生能、pDC, mDC 数の比較

MPO-ANCA 血管炎患者の IFN 産生能は IgA 腎症、健常人に比較して低下していた。健常人、IgA 腎症、MPO-ANCA 腎炎患者の IFN-α 産生能を測定したところ、健常人; 7934 ± 886, IgA 腎症 (慢性期); 8230 ± 898, MPO-ANCA 腎炎 (急性期); 4432 ± 936 IU/ml と、MPO-ANCA 腎炎患者の IFN-α 産生能は有意に低値であった (p < 0.001)。 (図 1)。

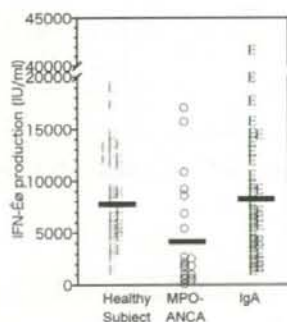


図1 健常人、MPO-ANCA 腎炎、IgA 腎症患者の IFN 産生能

MPO-ANCA 血管炎患者の IFN 産生能不全の成因をさぐるため、IFN を産生する主たる細胞である pDC 数を健常人、IgA 腎症、MPO-ANCA 血管炎患者の間で、比較した。図 2 に示すように、健常人、IgA 腎症患者に比較して MPO-ANCA 腎炎患者で pDC 数は、有意に低下していた。

同様に mDC 数を、健常人、IgA 腎症、

MPO-ANCA 血管炎患者の間で、比較した。図3に示すように、健常人、IgA 腎症患者に比較して MPO-ANCA 腎炎患者で pDC 数は、有意に低下していた。

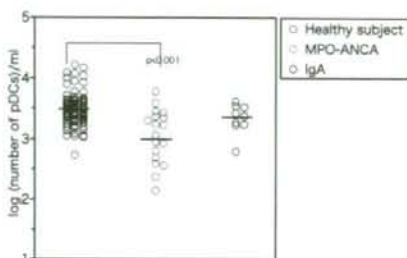


図2 健常人、MPO-ANCA 腎炎、IgA 腎症患者の pDC 数

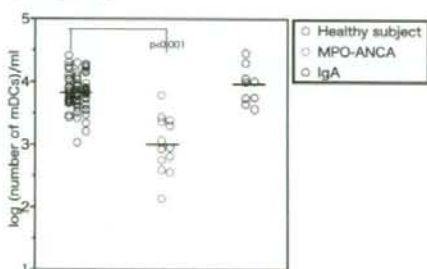


図3 健常人、MPO-ANCA 腎炎、IgA 腎症患者の mDC 数

C-2, MPO-ANCA 腎炎患者のサイトカイン動態の特性の検討

27plex array で、RANTES を除き、26 項目の血漿中サイトカイン・ケモカインを測定することが出来た。Table 1 に示すように健常人に比較して MPO-ANCA 腎炎患者では、IL-1 β , 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- γ , IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , 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

| | 健康人 | | MPO-ANCA腎炎 | | IgA腎症 | | | |
|----------------|--------|--------|------------|--------|---------|--------|--------|---------|
| | SE | p | SE | p | SE | p | | |
| IL-1 β | 0.077 | 0.06 | 0.263 | 0.197 | 0.00 | 0.044 | 0.111 | 1 |
| IL-1Ra | 2.24 | 0.205 | 2.212 | 0.689 | 0.009 | 1.87 | 0.082 | 0.1 |
| IL-2 | 0.275 | 0.336 | 0.803 | 0.14 | 0.044 | 0.107 | 0.14 | 1 |
| IL-4 | -0.064 | 0.263 | 0.078 | 0.12 | 0.85 | -0.207 | 0.12 | 0.94 |
| IL-5 | 0.618 | 0.301 | 1.894 | 0.177 | <0.0001 | 0.322 | 0.132 | 1 |
| IL-6 | 0.06 | 0.061 | 0.21 | 0.0688 | 0.009 | -0.101 | 0.091 | 1 |
| IL-7 | -0.272 | 0.0745 | 0.1885 | 0.187 | 0.0096 | -0.221 | 0.111 | 0.9 |
| IL-8 | 1.289 | 0.051 | 1.338 | 0.073 | 0.0188 | 0.84 | 0.078 | 0.0048 |
| IL-9 | 1.68 | 0.0833 | 2.398 | 0.118 | <0.0001 | 1.88 | 0.12 | 0.008 |
| IL-10 | 0.523 | 0.07 | 1.071 | 0.108 | 0.0010 | 0.795 | 0.106 | 0.3 |
| IL-12p70 | 0.389 | 0.087 | 1.241 | 0.16 | <0.0001 | 0.372 | 0.145 | 0.9 |
| IL-13 | 0.173 | 0.0604 | 0.806 | 0.087 | 0.013 | 0.135 | 0.09 | 1 |
| IL-15 | 0.884 | 0.058 | 0.845 | 0.0695 | 0.9 | 0.803 | 0.083 | 0.003 |
| IL-17 | 0.348 | 0.059 | 0.929 | 0.083 | <0.0001 | 0.893 | 0.084 | 0.0006 |
| Eotaxin | 1.701 | 0.04 | 1.71 | 0.039 | 1 | 1.587 | 0.061 | 0.4 |
| FGFbasic | 1.32 | 0.04 | 1.511 | 0.062 | 0.09 | 1.205 | 0.064 | 0.99 |
| GM-CSF | 0.878 | 0.084 | 0.828 | 0.12 | 0.88 | 0.888 | 0.12 | 0.99 |
| GM-CSF | 0.888 | 0.08 | 1.426 | 0.12 | 0.0021 | 0.8998 | 0.125 | 1 |
| IFN- γ | 1.126 | 0.06 | 1.657 | 0.087 | <0.0001 | 1.23 | 0.06 | 0.521 |
| IP-10 | 2.453 | 0.036 | 2.87 | 0.054 | <0.0001 | 2.901 | 0.053 | 0.98 |
| MCP-1 | 1.819 | 0.028 | 1.85 | 0.046 | 0.019 | 1.72 | 0.046 | 0.48 |
| MIP-1 α | 0.185 | 0.056 | 0.472 | 0.077 | 0.0007 | 0.152 | 0.0801 | 1 |
| MIP-1 β | 2.01 | 0.27 | 2.147 | 0.209 | 0.0314 | 1.93 | 0.0407 | 0.03 |
| PDGF-bb | 2.282 | 0.081 | 2.818 | 0.084 | <0.0001 | 2.81 | 0.081 | <0.0001 |
| TRF- α | 0.498 | 0.078 | 0.794 | 0.128 | 0.006 | 0.508 | 0.132 | 1 |
| VEGF | 1.27 | 0.081 | 2.04 | 0.074 | <0.0001 | 1.81 | 0.077 | 0.078 |

表1 健常人、MPO-ANCA 腎炎、IgA 腎症の血漿中サイトカイン・ケモカイン値（値は log(pg/ml)）

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。

C-3, 全血法による in vitro サイトカイン産生への IVIg 投与の影響

健常者の全血を培養液にて 4 倍希釈し、PHA

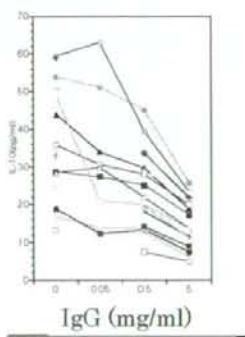


図4 PHA 刺激 IL-10 産生への IVIg の影響

で刺激、同時に IVIg を添加、産生されたサイトカイン産生への IVIg の影響を検討し

た。高濃度のIVIg添加によりIL-2, IL-12p70, IFN- γ , TNF- α のTh1サイトカインのみならず、IL-4, IL-13, IL-5, IL-10のTh2サイトカインの産生も抑制された。特に、IL-10の産生抑制は顕著であった。

D. 考案

MPO-ANCA血管炎患者のHVJ刺激IFN- α 産生能は、健康人に比較して有意に低下していた。またHVJ刺激に反応して、IFNを産生する細胞は、BDCA-2陽性細胞、即ちpDCであることが明らかにされているので、MPO-ANCA腎炎患者のpDCとmDC数について検討したところ、pDC, mDC共に低下していた。一方、IgA腎症患者では両者の低下は認められなかった。このようにMPO-ANCA腎炎患者のIFN- α 産生能、pDC, mDC数はIgA腎症と比較しても大きく低下しており、この疾患では、IFNシステムの不全が顕著であった。

また、Multi-plex法にて、血漿中サイトカイン・ケモカインを測定したところ、IL-9, IL-17, PDGF-bbは両腎炎に共通して上昇していたが、IL-1 β , IL-1Ra, IL-2, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, GM-CSF, IFN- γ , IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , VEGFは、MPO-ANCA腎炎で特異的に上昇していた。このように多くのサイトカインが血中で上昇しているMPO-ANCA腎炎にたいし、*in vitro*実験系にてPHA刺激サイトカイン産生系へのIVIg添加は多様なサイトカイン産生抑制効果を示すことが示された。患者へのIVIg療法の有効性の作用機作の一つとして考えられる。従って全血を用いた、PHA刺激サイトカイン産生抑制

効果の検討の系は、MPO-ANCA腎炎では、多様なサイトカイン・ケモカインが上昇していることから、人工γグロブリンのサイトカイン抑制効果を検討する為には、良い方法であると考えられた。

E. 結論

MPO-ANCA腎炎患者はIgA腎症と比較しても、重度のIFN- α 産生能不全、およびpDC, mDC数の低下が認められた。また多様なサイトカイン・ケモカインが高濃度で血漿中に認められた。従って、開発中の人工γグロブリン評価の系として、*in vitro*でのサイトカイン抑制効果による判定は、有効である可能性が推察された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 宇野賀津子、古宮俊幸、猪原登志子、田原佐知子、田中麻里、米本智美、塚本達雄、深津敦司、北徹、岸田綱太郎、鈴木和男、武曾恵理 (2004) MPO-ANCA 関連急速進行性腎炎再発症例におけるガンマグロブリン大量投与療法(IVIg)前後の免疫動態 Pasken J 17, 39-43
2. 宇野賀津子、猪原登志子、古宮俊幸、田原佐知子、田中麻里、米本智美、塚本達雄、深津敦司、北徹、岸田綱太郎、鈴木和男、武曾恵理 (2005) MPO-ANCA 関連腎炎再発症例における免疫グロブリン大量投与療法(IVIg)前後の免疫動態 Phama Medica 23, 94-96
3. 猪原登志子、宇野賀津子、田中麻里、山本聡、米本智美、古宮俊幸、田原佐知子、辻井知美、塚本達雄、南方保、小野孝彦、深津敦司、北徹、岸田綱太郎、大川原明子、小林美登里、鈴木和男、武曾恵理 MPO-ANCA 関連血管炎急性期のサイトカイン動態と大量ガンマグロブリン(IVIg)療法による変動 (2005) Pasken J 18, 67-78
4. 尾松芳樹、宇野賀津子、猪原登志子、梶田美由紀、三石瑠子、岸田綱太郎、稲葉カヨ、武曾恵理、鈴木和男 末梢血樹状細胞サブセットのフローサイトメトリーによる検討 (2005) Pasken J 18, 79-84
5. Hoshino A, Nagao T, Ito-Ihara T, Ishida-Okawara A, Uno K, Muso E, Nagi-Miura N, Ohno N, Tokunaka K,