

有弘、長田直樹、高橋一朗、牧野初音、
梅澤明弘 ヒト間葉系幹細胞の長期培養
による形質転換 第 32 回日本分子生物
学会年会 2009 年 12 月 (横浜)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を
含む)

1. 特許取得 特になし
2. 実用新案登録 特になし
3. その他 特になし

免疫グロブリン製剤によるヒト白血球 PBMC のサイトカイン産生への影響

研究分担者 大野 尚仁 東京薬科大学 教授

研究要旨：臨床において有用性の高い免疫グロブリン製剤（IVIg）は、その需要や安全性を確保するためにも人工化が望まれている。人工ガンマグロブリンの開発と臨床応用には、*in vitro* での評価法の確立と作用機序の解明が必要である。そこで本研究では、IVIg を用いて *in vitro* での評価法の確立を目指し、固相化 IVIg によるヒト末梢血単核球 (Peripheral Blood Mononuclear Cell : PBMC) のサイトカイン産生への影響を検討し、さらに IVIg の完全分子型、不完全分子型の活性の比較、そして各種 PAMPs (pathogen-associated microbial patterns) 刺激による PBMC からのサイトカイン誘導に対する IVIg の作用について検討した。その結果、固相化 IVIg は、*in vitro* で PBMC からの IL-8, TNF- α 産生を誘導した。さらに、完全分子型 (IVIg)、不完全分子型 (F(ab')₂) を固相化して活性を比較したところ、F(ab')₂ は IVIg と比較して PBMC に対する IL-8, TNF- α 産生誘導が著しく低かった。一方、PBMC からの PAMPs 誘導サイトカイン産生に対する IVIg の作用を、完全分子型と不完全分子型で比較すると、どちらの IVIg の PAMPs によって誘導される IL-8, TNF- α 産生を抑制することが明らかになった。

A. 研究目的

免疫グロブリン製剤 (IVIg) による治療は、無・低ガンマグロブリン血症、重症感染症、発性血小板減少性紫斑病、ギランバレー症候群、川崎病の急性期疾患に使用されており、なくてはならない製剤である。その需要や安全性を確保するためにも人工化が望まれている。人工ガンマグロブリンの開発と臨床応用には、*in vitro* での評価法の確立と作用機序の解明が必要であるが、IVIg の作用機序もまだ不明な点が多い。そこで本研究では、既存の IVIg を用いて *in vitro* 評価法の確立を目指し、ヒト PBMC に与える影響と、PAMPs 刺激ヒト PBMC に対するサイトカイン産生の抑制効果を検討した。

B. 研究方法

1. 免疫グロブリン製剤の固相化

IVIg を希釈し、プレート (96well Multi Well Plate 96FII) に各 125 μ l 添加後、1 晩 4 $^{\circ}$ C で incubate した。注射用水 200 μ l を用いて 6 回洗い流した後、プレートに吸着されているものを固相化 IVIg とした。

2. ヒト PBMC の培養

1 \times 10⁶ cells/ml に調整したヒト PBMC を、固相化 IVIg に添加、または PBMC を入れた well に IVIg, F(ab')₂ を添加し、37 $^{\circ}$ C 5%CO₂ インキュベーターで 8h-72h 培養後、上清を回収した。PAMPs を用いる系では 30 分 preincubate した PBMC に PAMPs を添加し、さらに 8h 培養した後、上清を回収した。

C. 研究結果

(1) ヒト PBMC *in vitro* 培養系での固相化 IVIg によるサイトカイン産生誘導

固相化 IVIg と IVIg の液相添加での PBMC からのサイトカイン誘導能を比較した。その結果, IVIg の液相での添加と比較して固相化 IVIg は PBMC からの IL-8 産生を著しく増加させた。TNF- α は, PBMC への IVIg 液相添加では誘導されなかったが, 固相化 IVIg では強く誘導された (Fig. 1)。

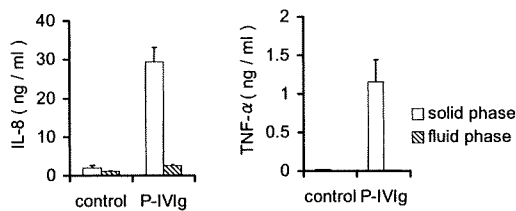


Fig.1 Production of IL-8 and TNF- α from PBMC cultured with solid phase IVIg or fluid phase IVIg

(2) 固相化 IVIg のサイトカイン誘導活性における Fc 領域の関与

固相化 IVIg のサイトカイン誘導活性に IgG の Fc が関与しているかを検討するために, F(ab')₂ を IVIg と同様に 96well プレートに吸着させ, 各 well に PBMC を添加後 8h 培養し, 回収した上清中の IL-8 と TNF- α の濃度を測定した。

その結果, 固相化 IVIg が IL-8 と TNF- α の産生を誘導するのに対し, 固相化 F(ab')₂ はどちらの産生も誘導しなかった (Fig.2)。

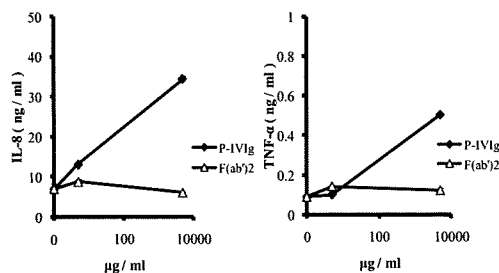


Fig.2 Production of IL-8 and TNF- α from PBMC cultured with solid phase IVIg or F(ab')₂

(3) PAMPs 誘導サイトカイン産生への IVIg の影響

TLR リガンド関連の各種 PAMPs (LPS, Pam3, Poly I:C) 用いて, PAMPs 誘導サイトカイン産生に対する IVIg の影響を検討した。健康人より PBMC を分離し, IVIg, F(ab')₂ を添加し, 30min, 37°C 5%CO₂ の条件で培養後, 各 PAMPs で刺激し, 8h 後に上清を回収し ELISA 法にて IL-8 と TNF- α の濃度を測定した。その結果, 全ての PAMPs による IL-8 の産生誘導に対して IVIg は有意な影響を与えなかった。2000 μ g/ml の F(ab')₂ を添加すると Pam3, Poly I:C 誘導 IL-8 産生を有意に抑制したが, LPS 誘導の IL-8 産生は抑制しなかった。LPS, Pam3 刺激による TNF- α 産生は, IVIg によって有意に抑制された。F(ab')₂ では全ての PAMPs 刺激による TNF- α 産生が有意に抑制された (Fig.3)。

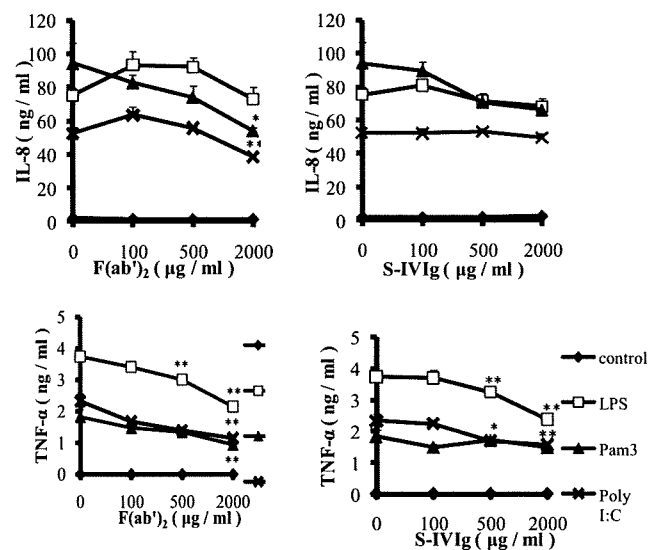


Fig. 3 Production of IL-8 and TNF- α from PBMC cultured with IVIg and variety of PAMPs

D. 考案

免疫グロブリン製剤 (IVIg) は細菌やウイルス等の感染症の予防や治療, IgG の置換療法その他, 特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) や川崎病, 慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー, ギラン・バレー症候群など様々な自己免疫疾患に使用されている。

IVIg 中の IgG 凝集体が ITP の改善や IFN- γ 応答を抑制するという報告から, IgG 凝集体モデルの固相化免疫グロブリン製剤 (固相化 IVIg) を作成し, PBMC のサイトカイン産生に与える影響を解析した。

その結果, 固相化 IVIg はヒト PBMC からの IL-8 と TNF- α 産生を強く誘導した。一方, F(ab')₂ を固相化した場合には IL-8 と TNF- α 産生は誘導されなかった。これらの結果より, 固相化 IVIg はヒト PBMC からのサイトカイン産生を誘導する活性があり, その活性は IgG の Fc 部分に依存している可能性が示唆された。

IVIg が各種 PAMPs (LPS, Pam3, Poly I:C) 誘導のサイトカイン産生に与える影響について解析した結果, IVIg と F(ab')₂ は各 PAMPs の種類に依らず IL-8 と TNF- α 産生を抑制した。IVIg と F(ab')₂ のサイトカイン抑制作用は同程度であったことから, その抑制作用は受容体や病原体の種類に依存しない可能性が示唆された。また, 自己免疫疾患には使用されていない F(ab')₂ も IVIg 同等の活性がある可能性が示唆された。

E. 結論

本研究により, ヒト PBMC からのサイトカイン産生に与える IVIg と F(ab')₂ の作用の多様性が示された。今後は作成した人工イムノグロブリン (hSyIg) を用いて固相化あ

るいは PAMPs 刺激における添加の系でヒト PBMC からのサイトカイン産生に与える影響について検討したい。これらの活性は hSyIg の活性を既存の生物製剤の活性と比較検討するための重要な評価法の一つであると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. N. N-Miura, M. Komai, Y. Adachi, N. Osada, Y. Kameoka, K. Suzuki, **N. Ohno**, IL-10 is a negative regulatory factor of CAWS-vasculitis in CBA/J mice as assessed by comparison with Bruton's tyrosine kinase-deficient CBA/N mice, *J Immunol*. 2009 Sep 1;183(5):3417-24.
2. K. Inoue, H. Takano, E Koike, R. Yanagisawa, T. Oda, H. Tamura, Y. Adachi, K. Ishibashi, **N. Ohno**, *Candida* soluble cell wall beta-glucan facilitates ovalbumin-induced allergic airway inflammation in mice: Possible role of antigen-presenting cells, *Respir Res*. 2009 Jul 21;10:68.
3. T. H-Hida, H. Kawaminami, K. Ishibashi, N. N-Miura, Y. Adachi, T. Yadomae, **N. Ohno**, Effect of GM-CSF on cytokine induction by soluble beta-glucan SCG in vitro in beta-glucan-treated mice, *Microbiol Immunol*. 2009 Jul;53(7):391-402.
4. A. Miyazato, K. Nakamura, N. Yamamoto, H. M. Mora-Montes, M. Tanaka, Y. Abe, D. Tanno, K. Inden, X. Gang, K. Ishii, K. Takeda, S. Akira, S. Saijo, Y. Iwakura, Y. Adachi, **N. Ohno**, K. Mitsutake, N. A. Gow, M. Kaku, K. Kawakami, Toll-like receptor 9-dependent activation of myeloid dendritic cells by Deoxynucleic acids from *Candida albicans*, *Infect Immun*. 2009 Jul;77(7):3056-64.
5. T. H-Hida, K. Ishibashi, N. N-Miura, Y. Adachi, Y. Shirasu, **N. Ohno**, Cytokine

induction by a linear 1,3-glucan, curdlan-oligo, in mouse leukocytes in vitro, *Inflamm Res.* 2009 Jan;58(1):9-14.

6. R. Tada, Y. Adachi, K. Ishibashi, **N. Ohno**, An unambiguous structural elucidation of a 1,3-beta-D-glucan obtained from liquid-cultured *Grifola frondosa* by solution NMR experiments, *Carbohydr Res.* 2009 Feb 17;344(3):400-4.

2. 学会発表

国際会議

1. N. N. Miura, M. Komai, Y. Adachi, Y. Kameoka, K. Suzuki, N. Ohno, Interleukin-10 is a negative regulatory factor of CAWS-vasculitis in CBA/J mice, The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology: ISHAM2009, 2009/05/25-29, Tokyo, Japan
2. Y. Takano, M. Arai, N. N. Miura, Y. Adachi, K. Suzuki, N. Ohno, Studies on immunotoxicity of water soluble polysaccharide complex fraction from culture supernatant of *Candida* spp., The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology: ISHAM2009, 2009/05/25-29, Tokyo, Japan
3. Y. Takano, M. Kouchi, N. N. Miura, Y. Adachi, H. Hanzawa, Y. Aizawa, K. Suzuki, N. Ohno, Interleukin-10 gene transfer inhibits the induction of CAWS vasculitis in mouse, The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology: ISHAM2009, 2009/05/25-29, Tokyo, Japan
4. N. Hirata, K. Ishibashi, S. Hata, T. Usui, J. Yoshioka, Y. Adachi, N. N., Miura, K. Suzuki, S. Ohta, K. Nakazawa, N. Ohno, The model of aortitis-induced heart failure in DBA/2 mice developed by fungal PAMPs, CAWS, water-soluble polymer complex obtained from *Candida albicans*, The

17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology: ISHAM2009, 2009/05/25-29, Tokyo, Japan

5. A. Yamamoto, Y. Miura, N. N. Miura, K. Ishibashi, Y. Adachi, T. Nagao, K. Suzuki, N. Ohno, Analysis of cytokine production from PBMC by stimulation with solid phased intravenous immune globulin, The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology: ISHAM2009, 2009/05/25-29, Tokyo, Japan
6. N. Ohno, N. N. Miura, K. Ishibashi, Y. Adachi, N. Hirata, A Murine Model of Coronary Arteritis Induced by Fungal PAMPs, CAWS, for Drug Development, EDDP2010 Int. Conference on Early Disease Detection and Prevention, 2010/02/25-28, Munich, Germany

国内会議

1. 三浦典子, 高野雄介, 安達禎之, 埴 晴雄, 相澤義房, 鈴木和男, 大野尚仁 C A W S 血管炎に対する I L - 1 0 遺伝子治療の効果 第 74 回日本インターフェロンサイトカイン学会・学術集会 2009 年 6 月 24-25 日 京都
2. 村上央, 三浦典子, 安達禎之, 石橋健一, 埴晴雄, 相澤義房, 鈴木和男, 大野尚仁 GM-CSF 遺伝子導入マウスの CAWS 反応性 第 15 回 MPO 研究会 2009 年 11 月 7-8 日 栃木
3. 三浦典子, 高野雄介, 安達禎之, 大野尚仁 CAWS 血管炎マウスへの IL-10 遺伝子導入の影響 日本薬学会 130 年会 2010 年 3 月 28-30 日 岡山

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 なし

MPO-ANCA 腎炎患者のインターフェロンシステム： 健常人、IgA 腎症との比較から

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：MPO-ANCA 腎炎患者のインターフェロンシステムの特徴を明らかにするために、MPO-ANCA 腎炎患者(急性期)、IgA 腎症 (慢性期、急性期)、健常人の IFN- α 産生能 (HVJ 刺激)、pDC 数、血漿中 IFN 値について比較検討した。IFN- α 産生能は、健常人； 8219 ± 655 、IgA 腎症； 8231 ± 1215 、MPO-ANCA 腎炎； 4432 ± 740 IU/ml と、MPO-ANCA 腎炎患者の IFN- α 産生能は健常人と比較しても有為に低値であり、全体の 60%以上が 4000 IU/ml 以下と低値を示した (vs 健常人：13%、IgA 腎症：27%)。さらに pDC 数は一部の MPO-ANCA 腎炎患者で極端に低下していたが、IgA 腎症患者では健常人と有意な差は認められなかった。また MPO-ANCA 腎炎患者の血漿中 IFN- α および β を測定したところ、IFN- α は IFN- α 産生能低値群の一部に、IFN- β は低値および高値群の一部に検出された。このように MPO-ANCA 腎炎患者では、インターフェロンシステム不全が認められ、このことがその後の高サイトカイン血症の進展と関連する可能性が考えられた。

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。またこれまでの研究から、MPO-ANCA 血管炎患者は抗サイトカイン血症の状態にあることが明らかとなっている。私達は、高サイトカイン血症の前段階として、この疾患にはインターフェロン (IFN) システムの不全が存在し、この事がその後の高サイトカイン血症を引き起こしている可能性があると考えた。そこで、MPO-ANCA 血管炎のインターフェロンシステムを同じ腎疾患である IgA 腎症と比較しつつ検討した。

B. 研究方法

B-1、対象

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=39)と、北野病院でMPO-ANCA 腎炎と診断されたの治療前患者 (n=34)、IgA 腎症患者 (治療前&治療中n=37) を対象とした。

B-2、MPO-ANCA血管炎患者のIFN- α 産生能と測定

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。

B-3、プラズマサイトイド樹状細胞 (pDC) 数の測定

全血を用いて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^{high+}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-4、血中 IFN- α 、 β の検討

MPO-ANCA 腎炎、および IgA 腎症患者の、血漿中の IFN- α および β を測定した。IFN- α の幅広いサブタイプの測定が可能な VeriKineTM Human IFN Alpha Serum Sample ELISA Kit (PBL 社) にて、IFN- β は ProcarartaTM Cytokine Human IFN- β ビーズアレイにて測定した。

C. 研究結果

C-1. MPO-ANCA 血管炎患者, IgA 腎症患者の IFN 産生能

MPO-ANCA 血管炎患者では、IgA 腎症、健康人に比較して、高い割合で IFN 産生能が低いヒトが認められた。健康人、IgA 腎症、MPO-ANCA 腎炎患者の IFN- α 産生能は、健康人 ; 8219 \pm 655, IgA 腎症 (慢性期及び急性期) ; 8231 \pm 1215, MPO-ANCA 腎炎 (急性期) ; 4432 \pm 740 IU/ml と、MPO-ANCA 腎炎患者の IFN- α 産生能は有為に低値であった ($p < 0.001$)。 (図 1)。

さらに、健康人、MPO-ANCA 腎炎、IgA 腎症患者の IFN- α 産生能を、低値群 (4,000IU/ml 以下)、正常値群 (4,000~13,000IU/ml)、高値群 (13,000IU/ml) に分け、検討したところ、表 1 に示すように

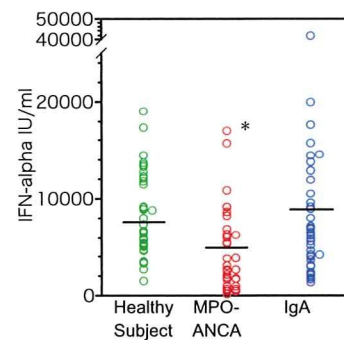


図 1 健康人、MPO-ANCA 腎炎、IgA 腎症患者の IFN 産生能

MPO-ANCA 腎炎患者の 60%以上が低値群に属することが、明らかにされた。

表 1 健康人、MPO-ANCA 腎炎、IgA 腎症患者の IFN- α 産生能の分布

	n	IFN- α production (IU/ml)		
		$\leq 4,000$	4,000 - 13,000	$\geq 13,000$
Subjects		(%)	(%)	(%)
Healthy subjects	39	5 (12.8)	28 (71.8)	6 (15.3)
MPO-ANCA nephritis	34	21 (61.7)	11 (32.3)	2 (5.9)
IgA Nephritis	37	10 (27.0)	20 (54.0)	7 (18.9)

C-2、プラズマサイトイド樹状細胞数の比較

IFN を産生する主たる細胞はプラズマサイトイド樹状細胞 (pDC) であることが明らかにされている。そこで、MPO-ANCA 血管炎患者の IFN 産生能不全の成因をさぐるため、pDC 数を健康人、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、健康人、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。

さらに、IFN 産生能不全が、pDC 数に起因するのか、細胞の機能障害に起因するのかを明らかにするために、対数変換した IFN- α 産生能、pDC 数をプロットし、健康人の値を基に 95% 確率楕円を作成した。その結果 IgA 腎症患者に比較して MPO-ANCA 腎炎患者で pDC 数そのものが、すくなく、また 1 個あたりの産生量も少ないことも明らかとなった。 (図 3)

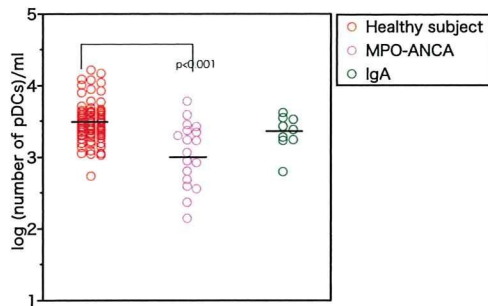


図2 健常人、MPO-ANCA 腎炎、IgA 腎症患者の pDC 数

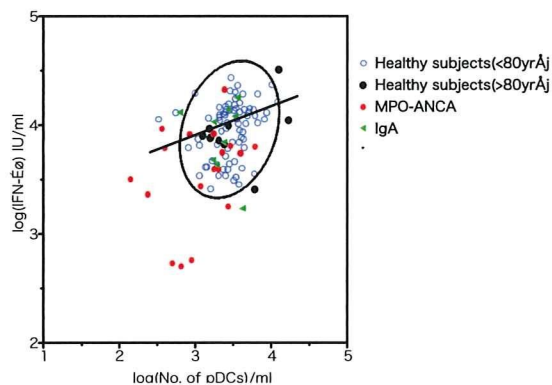


図3 健常人、MPO-ANCA 腎炎、IgA 腎症患者の pDC 数と IFN 産生能の関連性

C-2, MPO-ANCA 腎炎患者の血中 IFN- α 、 β の検討

Type I IFN (IFN- α 、 β) は、弱い Type I IFN の存在により、更に大量の IFN を産生 (Priming)、一方、十分量の IFN が産生されると産生が抑制されるという調節作用がある (Negative regulation)。従って、低 IFN 産生と血中 IFN との関連について検討した。

健常人、MPO-ANCA 腎炎患者、IgA 腎症患者の血中 IFN- α および β を測定した。健常人からは、ほとんど血中 IFN は検出できなかった。一方、MPO-ANCA 腎炎患者の血中からは図 4 に示すように、IFN 産生低値群で、高頻度で IFN- α および β が認められた。特

に IFN- β は低値群で、高頻度で認められた (図 4、表 2)。

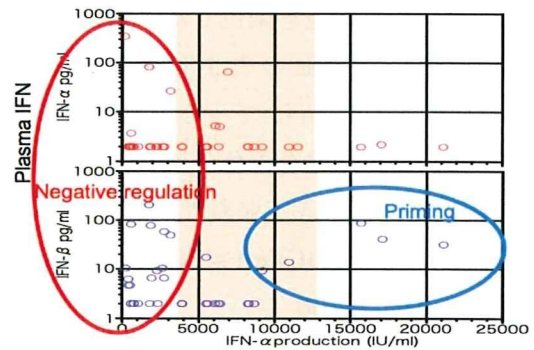


図4 MPO-ANCA 腎炎患者の IFN- α 産生能と血中 IFN- α 、 β

表2 MPO-ANCA 腎炎患者の IFN- α 産生能と血中 IFN- α 、 β

MPO-ANCA nephritis	IFN- α production (IU/ml)		
	$\leq 4,000$	4,000 - 9,000	$\geq 9,000$
n	23 (21.7%)	12 (8.3%)	6 (6%)
Plasma IFN- α positive	5 (21.7%)	1 (8.3%)	0 (0%)
Plasma IFN- β positive	13 (56.5%)	1 (8.3%)	6 (100%)

E. 結論

MPO-ANCA 腎炎患者は IgA 腎症と比較しても、重度の IFN- α 産生能不全が認められた。その一因として、大量の IFN 産生細胞である pDC 数の低下が認められた。また、特に IFN 産生能低値群に高頻度で、血中の IFN- α あるいは β の存在が認められた。このことは、慢性的な Type I IFN の存在により、IFN 産生が抑制されている可能性もまた考えられる。

このような Type I IFN システムの不全が、その後の高サイトカイン・ケモカイン血症に繋がる可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Uno, K., Okuno K, Yagi K., Hamuro J
Prediction of overall survival through pre-operative blood plasma of colorectal cancer patients. 2009, Cytokine, 48 p.52
2. K. Uno, E. Muso, T. Ito-Ihara, K. Yagi, S. Fujita, and K. Suzuki. Comparison of plasma cytokine/chemokine levels and IFN-alpha production capacity amongst healthy subjects, MPO-ANCA-positive MPA patients, IgA nephritis. APMIS 2009 June;117:136
3. 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, and 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. APMIS 2009 June;117: 173
4. Tominaga M, Uno K., Yagi K., Fukui M., Hasegawa G, Yoshikawa T, Nakamura N
Association between capacity of interferon- α production and metabolic parameters. J IFN cytokine Res. In press.
5. 宇野賀津子 サイトカインハンティング:先頭を駆け抜けた日本人研究者達 2009 細胞工学 11月号 Vol. 28, No. 11, 1113-1115
6. 宇野賀津子 インターフェロン- α, β, γ 日本臨床 63 巻増刊号 8 広範囲血液・尿化学検査 免疫学検査-その数値をどう

読むかー [第7版] 印刷中

2. 学会発表

国際会議

1. Toshiko Ito-Ihara, Eri Muso, Shigeto Kobayashi, Kazuko Uno, Naoto Tamura, Yuji Yamanishi, Atushi Fukatsu, Richard A. Watts, David G. Scott, David R. Jayne, Kazuo Suzuki, and Hiroshi Hashimoto. A comparative study of the diagnostic accuracy of ELISA systems for the detection of anti-neutrophil cytoplasm antibodies available in Japan and Europe. 14th International Vasculitis and ANCA Workshop. Lund, Sweden. June 2009 [Poster No.T1]. 2009.
2. Kazuko Uno, Eri Muso, Toshiko Ito-Ihara, Katsumi Yagi, Setusya Fujita, and Kazuo Suzuki. Comparison of plasma cytokine/chemokine levels and IFN-alpha production capacity amongst healthy subjects, MPO-ANCA-positive MPA patients, IgA nephritis. 14th International Vasculitis and ANCA Workshop. Lund, Sweden. June 2009 [Poster No.K5]:2009.
3. Uno, K., Okuno K, Yagi K., Hamuro J
Prediction of overall survival through pre-operative blood plasma of colorectal cancer patients. 2009, October 18-21 Lisbon, Portugal

国内会議

1. 武曾恵理、城謙輔、宇野賀津子、猪原登志子、古宮俊幸、鈴木和男。顕微鏡的多発血管炎における血中サイトカイ

- ン・ケモカインの特性-IgA 腎症との対比。第 52 回日本腎臓学会学術総会、平成 21 年 6 月 3 日、横浜。
2. 富永真澄、宇野賀津子、八木克巳、福井道明、長谷川剛二、吉川敏一、中村直登 IFN- α 産生能とメタボリック因子 第 74 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2009 年 6 月 26, 27 日 京都
3. 宇野賀津子 モノサイトのレドックス制御と抗腫瘍免疫応答 第 74 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2009 年 6 月 26, 27 日 京都
4. 宇野賀津子、武曾恵理、猪原登志子、鈴木和男 MPO-ANCA 腎炎、IgA 腎症患者、健常人の血漿中多項目サイトカイン・ケモカイン動態の比較 第 9 回抗加齢医学会総会 2009 年 5 月 28 日、29 日 東京
5. Uno K, Okuno K Prediction of anti-tumor immunity and life prognosis through pre-operative blood plasma of colorectal cancer patients 第 68 回日本癌学会学術総会 2009 年 10 月 1-3 日 横浜
6. 宇野賀津子、奥野清隆 モノサイトのレドックス制御と抗腫瘍免疫応答：末梢血で解る予後予測パラメーター バイオセラピー学会 2009 年 11 月 26、27 日 大阪
7. Uno K, Muso E, Ito-Ihara T, Suzuki K Comparison of IFN- α systems amongst healthy subjects, MPO-ANCA nephritis patients, and IgA nephritis patients 第 15 回 MPO 研究会 2009 年 11 月 78 日 栃木
8. K Uno, K Okuno, J Hamuro Prediction of overall survival through pre-operative blood plasma cytokine/chemokine/MMPs of colorectal cancer patients 第 39 回日本免疫学会学術集会 2009 年 12 月 2-4 日 大阪
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
- I. 特許取得
なし
- J. 実用新案登録
なし
- K. その他
なし

難治性血管炎の遺伝子解析

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）が何故、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かについての仕組みを理解する手段のひとつとして、難治性血管炎をはじめとした、自己免疫疾患患者の末梢血液細胞すなわち末梢血単核球（PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cell）で転写誘導（抑制）されている多種類の遺伝子を単離し、そのうちのいくつかは各自己免疫疾患特有の転写誘導（抑制）を示すことを見出してきた。これら遺伝子は良い診断マーカーになりうるが、実際にベッドサイドで実用化するには、壊れやすいRNAの扱いが容易でないこともあって、敷居が高いのが実情である。この問題を克服するため、本年度では簡便かつ迅速にPBMC（主として白血球）からタンパク質を回収できる新規な技術を開発したので報告する。

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（mRNA）の転写レベルを個々の患者で調べることに並行して、遺伝子産物であるタンパク質の発現量を迅速に検査・診断できる技術を開発することも目的とする。確定診断の難しい血管炎において、mRNAとタンパク質の発現パターンを組み合わせるタイプの新規な診断マーカーとして用いる可能性も探る。

B. 研究方法

この技術では白血球のみを捕獲できるフィルターを複数枚セットした、リュウーコキ

ヤッチ(LeukoCatch)と命名した注射器を用いる（特許を申請中）。これに長い針を装備したNIPRO-18Gx2を装着し、採血済みの真空採血管(EDTA:2mL)に突き刺して5回往復させることで白血球をフィルターに捕獲する（図1）。これを別の容器に入れた10mLの生理食塩水(PBS)で2回往復させることでフィルターに付着した赤血球を洗浄する。そこに0.5mLのタンパク質溶解液を回往復させることで白血球全タンパク質抽出液をフィルターから溶出・回収する。溶出した抽出液はエッペンチューブ2本へ分注し、一方へは100% glycerolを最終濃度20%になるように加え、4℃にて回転混濁させて混ぜ、-80℃保存する（長期保存用）。もう一方へは4×Sample Bufferを加え、7分間煮沸し、-30℃保存する（臨床現場診断用）。このうち一部、たとえば10μL（全量

の 1/35~1/27)、をウエスタン解析に使用する。

これら溶出液は ELISA やウエスタン解析などの検査まで室温でさえ何日も長期保存できる。

末梢血細胞全タンパク採取キット

全血から白血球だけを選択的にトラップ。

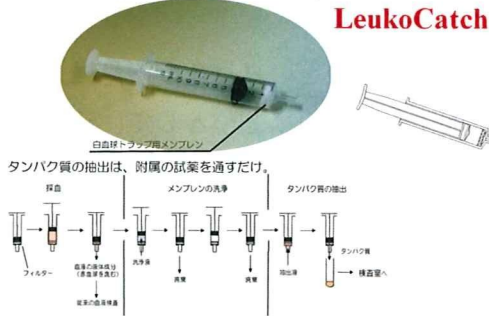


図 1 : リュウコキャッチ(LeukoCatch)の製品イメージと操作原理の図解。

(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、健康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

MONO-MAC-6 細胞を用いて 2 回吸引・排出した場合

マクロファージ由来のヒト培養単球(monocyte)を10cmシャーレで培養して、同じ数量(10cmシャーレ1枚分の5分の1量:およそ 2×10^6 個の細胞)の細

胞を準備し、フィルター数を0, 1, 3, 5, 7あるいは10枚を備えたそれぞれのLeukoCatchで吸引したのち押し出して15mLコニカルチューブに集めてFACS解析とウエスタン解析をした。FACS解析により、フィルターに捕獲されなかった細胞のDNAヒストグラム解析を行い、各群のDNA量(細胞数)のパターンを比較したところ、LeukoCatchに備えたフィルター数が1~10枚と増えるにつれてフィルターに捕獲されなかった細胞数が漸減していた(Fig.1A)。右上のFACSパターン(5枚フィルター使用の場合)は使用した細胞が健康に増殖していたことを示している。

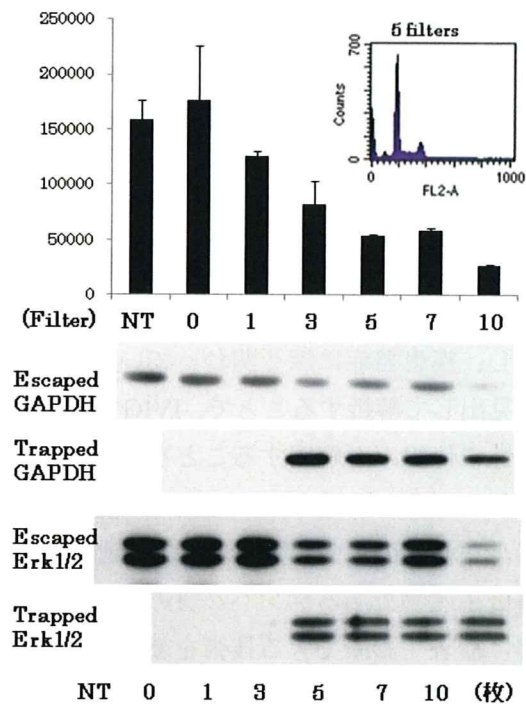


図 1 : MONO-MAC-6 細胞について、様々な数のフィルターを備えた LeukoCatch を 2 回繰り返し通過させた排出分画の解析結果。

- A. フィルターに捕獲されなかった細胞数を FACS によりカウントした(n=4)。
- B. フィルターに捕獲されなかった細胞から溶出した抽出液 5 μ L (10 分の 1 量) を用い、GAPDH を検出した。
- C. フィルターに捕獲された細胞から溶出した抽出液 13.8~18.8 μ L (20 分の 1 量) を用い、GAPDH を検出した。

GAPDH (どの細胞でも発現している解糖系酵素), Erk1/2 (増殖細胞に発現しているシグナル伝達因子), CD68 (単球細胞マーカー) に対する抗体を用いてウエスタン解析したところ、FACS 解析の結果と合致した傾向に従い、フィルター数が1~10枚と増えるにつれてバンドの強度(これら抗原タンパク質を反映する)が漸減していた(Fig.1B)。

一方、フィルターに捕獲された細胞は0.5ml のタンパク質溶解液を吸引して溶出し、その一部をウエスタン解析した(Fig.1C)。その結果、フィルター数が1枚や2枚では捕獲されるタンパク質の量は少ないが、3枚以上では上記のいずれの抗原に対しても大差なく十分な量が捕獲されていた。

MONO-MAC-6 細胞を用いて1~5回吸引・排出した場合

次に LeukoCatch に備えたフィルター数を5枚に固定して、吸引・排出回数による捕獲量の変動を調べた。FACS 解析の結果、フィルターに捕獲されなかった細胞数は細胞吸引・排出の回数が1~5回と増すにつれて漸減していた(Fig.2A)。ウエスタン解析の結果は、たとえば GAPDH について、捕獲されなかった分画では回数が増すにつれて漸減していたが(Fig.2B)、逆に捕獲された分画では回数が増すにつれて漸増していた(Fig.2C)。Erk1/2 や CD68 についても、同様の結果が得られた。

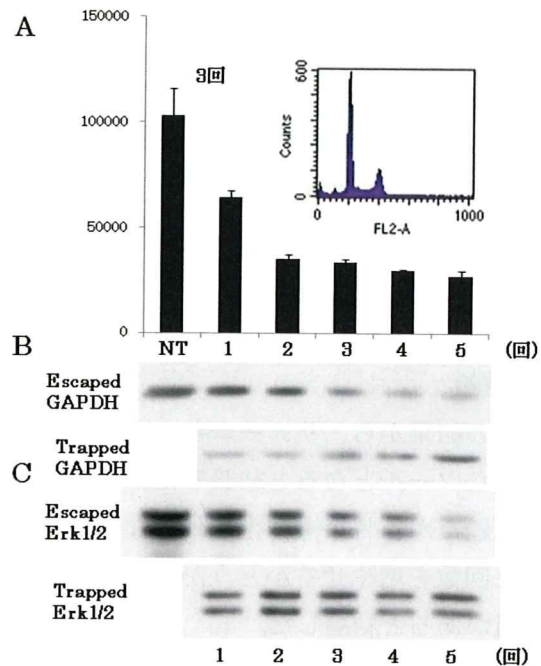


図1: MONO-MAC-6 細胞について、5枚フィルター付き LeukoCatch を用いて吸引・排出を1~5回繰り返した各回数の排出分画の解析結果。
A. フィルターに捕獲されなかった細胞数を、FACSにより、カウントした(n=4)。
B. western blotting により、フィルターに捕獲されなかった細胞から溶出したタンパク質から GAPDH を検出した。
C. western blotting により、フィルターに捕獲された細胞の溶出液から GAPDH を検出した。

その他

遺伝子診断に用いる可能性のある遺伝子産物などについての機能解析のための基礎データを収集した。また、難治性血管炎と関連の深い慢性糸球体腎炎 (IgA 腎症) についての臨床データをDNAマイクロアレイ解析した。

D. 考察

図2の結果から、フィルター数が7枚や10枚の場合は分厚くて細胞吸引・排出が滑らかでないこと、3枚では捕獲されないタンパク質もある可能性を考慮すると、これらの結果はフィルター数5枚が適量である

ことを示唆すると考察した。図3の結果からは、手間を惜しまなければフィルターを通過させる回数が多い方が良いことが示唆されるが、回数が増えるにつれて泡がでてタンパク質が変性するなど何かと不便なので、手作業では5回くらいが限度であろうと考察した。

E. 結論

上記の結果から、リューコキャッチは将来有望なツールとなると結論した。洗浄回数が課題だが、将来機械化されるならば、もっと回数を増やせるかどうかの検討をする価値があると結論した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Nishioka, N., Inoue, K., Adachi, K., Kiyonari, H., Ota, M., Ralston, A., Yabuta, N., Hirahara, S., Stephenson, R. O., Ogonuki, N., Makita, R., Kurihara, H., Morin-Kensicki, E. M., Nojima, H., Rossant, J., Nakao, K., Niwa, H., and *Sasaki, H. The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophectoderm from inner cell mass. *Dev Cell*. 2009 Mar;16(3):398-410.
- (2) Sato, J., Shimizu, H., Kasama, T., Yabuta, N. and Nojima, H. GAK, a regulator of clathrin-mediated membrane trafficking, localizes not only in the cytoplasm but also in the nucleus. *Genes Cells*,14, 627-641, 2009.
- (3) Shimizu, H., Nagamori, I., Yabuta, N., and Nojima, H. (2009). GAK, a regulator of

clathrin-mediated membrane traffic, also controls centrosome integrity and chromosome congression. *J Cell Sci*. 2009 Sep 1;122(Pt 17):3145-52.

- (4) Iio K, Nagasawa Y, Iwatani H, Yamamoto R, Horii A, Okuzaki D, Furumatsu Y, Inohara H, Nojima H, Imai E, Isaka Y, Rakugi H. Microarray analysis of tonsils in Immunoglobulin A nephropathy patients. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010, in press.

2. 学会発表

国際会議

D. Okuzaki, T. Fukushima, T. Tougan, T. Ishii, S. Kobayashi, T. Akita and H. Nojima: GenopalTM; a novel device for focused microarray equipped with hollow fiber array, The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, September 10, 2009.

国内会議

1. 奥崎大介、野島博: DETECT システムの開発:第 82 回日本生化学会大会(神戸ポートアイランド)平成 21 年 10 月 21 日

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許出願

(1) 白血球タンパク質の回収方法および回収装置 (特願 2009-245168) 【発明者】野島博、藪田紀一、奥崎大介【出願者】大阪大学知的財産本部 (管理番号 K2009-0042) 【出願日】2009 年 (平成 21 年) 10 月 26 日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

CAWS 誘発血管炎モデルにおける TNF- α 製剤の血管炎抑制効果

研究分担者 高橋 啓 東邦大学大橋病院病理 教授
研究協力者 大原関利章、横内幸、山田仁美、佐地勉(東邦大小児)、
三浦典子、大野尚仁(東薬大)、鈴木和男(千葉大)

研究要旨： CAWS 誘発マウス血管炎モデルに対して免疫グロブリンを投与した場合血管炎発生は抑制されることをこれまでに示した。本研究では近年川崎病などの血管炎疾患に対する新たな治療戦略として試みられつつある TNF- α 製剤に注目し、血管炎抑制効果について検討した。その結果、TNF- α 製剤投与により血管炎は著明に抑制され、本実験モデル血管炎発生に TNF- α が関与していることが示唆された。

A. 研究目的

CAWS 誘発マウス血管炎モデルに対して TNF- α 製剤投与による血管炎抑制作用を検討する。

の軽減化傾向を認めたが、有意差は得られなかった。

いずれの群においても発生した血管炎の組織像に明らかな差異を見いだせなかった(図 1)。

B. 研究方法

C57BL/6N マウス(4 週齢、雄)に対し CAWS 4mg を連続 5 日間腹腔内接種した。次いで、インフリキシマブおよびエタネルセプトを複数回、腹腔あるいは皮下投与した。実験 5 週目に屠殺、大動脈起始部および冠状動脈のステップ標本作製し、汎血管炎の発生頻度、血管炎の広がりや炎症の程度を病理組織学的に検討した。

表 1 炎症範囲
冠状動脈、大動脈起始部を 5 区域に分けた時の 1 マウスあたりの有炎症区域数

	mean	sd	
CAWS	1.18	1.24	
CAWS + IFX	1.00	1.04	ns
CAWS + ETA	0.32	0.63	P<0.001

C. 研究結果

エタネルセプト投与群では未治療群と比較して汎血管炎の発生頻度、炎症の範囲、炎症の程度いずれも有意に抑制された(表 1, 2)。

一方、インフリキシマブについては炎症

表 2 炎症程度
炎症の程度を 0(変化なし)~3(汎血管炎)に分類した時の 1 マウスあたりの炎症スコア

	mean	sd	
CAWS	2.20	2.72	
CAWS + IFX	1.52	1.90	ns
CAWS + ETA	0.40	0.91	p<0.01



図1 血管炎病理組織像

D. 考案

本実験系では CAWS 投与後早期に血漿 TNF- α が上昇することが明らかになっている。この TNF- α 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しうることが示された。他の数種の炎症性サイトカインレベルも本製剤投与により低下する結果を得ており、様々な因子を介した抗炎症作用機構の関与が推測された。今回用いた TNF- α 抗体製剤と TNF- α 受容体製剤との間で効果に差が生じたことについて種差、投与量、投与方法などの検討を行っている。

E. 結論

本血管炎誘発モデルにおいて、TNF- α 製剤は血管炎発生に抑制的に働くことが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 高橋啓, 大原関利章, 横内幸: 急性期冠状動脈炎とその後の遠隔期硬化性病変への移行—成人期動脈硬化症との違い—を考察する *Journal of Vascular Medicine* 6: 22-26, 2010
2. Yokouchi Y, Oharaseki T, Ihara F, Naoe S, Sugawara S, Takahashi K: Repeated stent thrombosis after DES implantation and localized hypersensitivity to a stent implanted in the distal portion of a coronary aneurysm thought to be a sequela of Kawasaki Disease: an autopsy report *Pathology International* 60: 112-118, 2010
3. Takahashi K, Oharaseki T, Yokouchi Y, Miura NN, Ohno N, Okawara AI, Murata H, Naoe S, Suzuki K. Administration of human immunoglobulin suppresses development of murine systemic vasculitis induced with *Candida albicans* water-soluble fraction: an animal model of Kawasaki disease. *Mod Rheumatol*. 2009 Nov 27.

2. 学会発表

【国際会議】

1. Takahashi K, Oharaseki T, Yokouchi Y, Ihara F, Yamada H, Naoe S: Involvement of polymorphonuclear leukocytes and macrophages in the coronary artery injury at acute Kawasaki Disease. 14th International Vasculitis and ANCA Workshop, 2009. 6, Lund, Sweden
2. Takahashi K, Oharaseki T, Yokouchi Y, Yamada H, Mamada H, Naoe S, Saji T, Ohno N, Suzuki K: Effect of anti-TNF-alpha medicaments in mice

vasculitis model caused by *Candida albicans* water soluble fraction. 14th International Vasculitis and ANCA Workshop, 2009. 6, Lund, Sweden

3. Oharaseki T, Yokouchi Y, Ihara F, Yamada H, Suzuki K, Naoe S, Takahashi K: Histopathology of late-stage arteritis in murine systemic vasculitis induced by polysaccharide of *Candida albicans* 14th International Vasculitis and ANCA Workshop, 2009. 6, Lund, Sweden

学会名古屋 2009/10

- 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
なし

【国内会議】

1. 儘田洋, 大原関利章, 横内幸, 直江史郎, 武藤里志, 佐地勉, 定本清美, 大野尚仁, 高橋啓: 川崎病動脈炎モデルにおける抗 TNF- α 療法の血管炎抑制効果の組織学的検討第 15 回 MPO 研究会宇都宮 2009/11
2. 横内 幸, 大原関利章, 高橋啓: 日本病理剖検輯報を用いた高安動脈炎の臨床病理学的検討第 50 回日本脈管学会総会東京 2009/10
3. 大原関利章, 横内幸, 伊原文恵, 儘田洋, 武藤里志, 定本清美, 高橋啓: 川崎病動脈炎モデルにおける抗サイトカイン療法の血管炎抑制効果の組織学的検討第 29 回日本川崎病学会名古屋 2009/10
4. 横内幸, 大原関利章, 高橋啓: 高安動脈炎の臨床病理学的検討-日本病理剖検輯報の解析から-第 14 回血管病理研究会佐賀 2009/10
5. 高橋 啓, 大原関利章, 横内幸, 山田仁美, 直江史郎: 剖検統計からみた小児血管炎と川崎病第 29 回日本川崎病

免疫グロブリンの評価法としてのモデルマウスの検討

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：高橋 啓 東邦大学医療センター大橋病院 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
協 力：大野尚仁 東京薬科大学 教授

研究要旨：人工ガンマグロブリンによる血管炎発症の治療効果を判定する目的で、急速進行性糸球体腎炎（Rapid progressive Glomerulonephritis; RPGN）を自然発症する SCG/Kj「RPGN モデルマウス」および CAWS(*C. albicans* 由来の mannoprotein-1,3- β -glucan) 誘発の「冠状動脈炎モデルマウス」を開発してきた。本年度は、RPGN 発症に伴って半月体形成率と有意な相関が認められた interleukin-6(IL-6), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) の内、抗 IL-6 receptor (IL-6R) 抗体が関節リウマチなどに対する治療に有効性が認められていることから、抗 IL-6R 抗体投与により IL-6 の RPGN 発症への関与を解析した。また、ANCA 関連腎炎の寛解維持療法としての有効性が期待されているミゾリビン、および SCG/Kj マウスの RPGN に対して改善効果を示す 15-deoxyspergualin (DSG) を投与し比較した。その結果、抗 IL-6R 抗体により MPO-ANCA の低下が認められた。また、ミゾリビンの投与では緩和傾向が認められ、DSG の投与では尿所見、腎臓の病理組織所見、血清中の MPO-ANCA 値、脾臓中の CD3+B220+細胞のパラメーターで、有意な治療効果が認められた。さらに、DSG 投与によって IL-2, IL-12(p40), MIP-1 β の有意な低下が認められた。以上より、IL-6 が初期の自己抗体産生への関与が示唆され、新たな発症因子として IL-2, IL-12(p40), MIP-1 β が挙げられた。また、免疫グロブリンと同様に DSG の寛解導入薬としての有用性が認められた。緩解導入後に、副作用の少ないミゾリビンによる維持療法薬として併用することで、奏功を得られる可能性が推察された。一方、CAWS 誘導の「冠状動脈炎モデル」に、ミゾリビン投与することで、冠状動脈炎の減少、上昇した炎症性サイトカインの低下が認められた。これらのモデルマウスの治療の成績から、モデルマウスの有用性と、人工ガンマグロブリンによる血管炎発症の治療効果の判定マーカーとして有用であることが示された。

A. 研究目的

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を活性することで深く関与している (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、また、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てきた。我々は、昨年度まで、*C. albicans* 由来 mannoprotein-1,3- β -glucan (CAWS) によって誘導される冠状動脈炎モデル (川崎病様) マウスの IL-1 β 、IL-6、IL-12p70、IL-17、IL-23 などの炎症性サイトカインを中心

に Bio-Plex により網羅的に定量・解析してきた。

本年度は、人工ガンマグロブリンによる血管炎発症の治療効果を判定する目的で、RPGN を自然発症する SCG/Kj 「RPGN モデルマウス」および CAWS 誘発の「冠状動脈炎モデルマウス」を用いて、モデルマウスの治療の成績の取得、モデルマウスの有用性と、人工ガンマグロブリンによる血管炎発症の治療効果の判定マーカーとして有用であることを検討することを目的とした。

B. 研究方法

1. マウス

マウス: SCG/Kj マウス (日本化薬、雌) initial phase 群: 6~7 週齢、active phase 群: 14~15 週齢、また薬剤投与群: 8~10 週齢、Control 用マウス: C57BL/6 (日本クレア、雌 9~10 週齢) を SPF 環境下にて千葉大学医学部動物室で飼育・投与実験に使用した。CAWS 誘導マウス: C57BL/6 (日本クレア、雄、4-5 週齢) を SPF 環境下で国立感染症研究所にて飼育した。マウスの飼育・処置は、千葉大学および国立感染症研究所の動物実験ガイドラインに基づいて行った。

2. 尿検査

ウロペーパー (栄研化学) を用いて尿蛋白、尿潜血 (ヘモグロビン・赤血球)、白血球を測定した。

3. 投与実験

3-1) 抗 IL-6R 抗体投与: 投与初回は、抗 IL-6R 抗体 (中外製薬、2 mg/mouse) を iv した。1 週間後、抗 IL-6R 抗体を週 1 回 500 µg/mouse、3 週間連続 ip 投与した。

3-2) ミズリビンの投与: ミズリビン (旭化成ファーマ) は、CAWS 誘導マウスに投与した。

3-3) DSG の投与: DSG (日本化薬、0.1 mg/mouse, 0.02 mg/mouse) 30 日間連続 ip 投与した。

4. CAWS 投与による冠状動脈炎誘導

C. albicans IFO 1385 を完全合成培地の培養上清より水溶性画分 CAWS を精製し、PBS で 20 mg/ml に調整しオートクレーブした。マウスに腹腔内投与 (4 mg/マウス) 5 日間連日 ip 投与した。CAWS 投与開始 3 日目からミズリビン (30 mg/kg/day) を 6 日間連日 ip 投与した。27 日後に屠殺し採血し、心臓、腎臓をホルマリン固定し、組織を観察した。

5. 血清採取

血清採取: ネンブタールで安楽殺したマウス

から心採血し、30 分間室温で静置し、5000 rpm、4°C で 15 分間遠心後、上清を回収した。

6. 組織学的検討

Hematoxylin-Eosin (HE) 染色: 中性ホルマリンにて固定した腎臓は、パラフィン切片を作製後、HE 染色し光学顕微鏡で観察を行った。

7. 血清中の MPO-ANCA 値の測定

MPO を Coating buffer (15 mM sodium carbonate, 35 mM sodium bicarbonate (pH 9.6)) に溶解し、4°C、overnight でコーティングし、0.2 µg/well に調整した。2 次抗体として、alkaline phosphatase-labeled anti-mouse IgG antibody (Jackson Lab.) で反応させ、Substrate buffer を加え、1 時間室温でインキュベートし、マイクロプレートリーダーで吸光度 (405 nm) を測定した。MPO-ANCA は、rabbit の standard serum を用いて算出し、単位を µg/ml と表示した。

8. サイトカイン・ケモカインの測定

各投与実験で得られたマウスの血清中のサイトカイン・ケモカインを、Bio-Plex™ Suspension Array System (BIO-RAD) を使用し、網羅的に解析した。

9. リンパ球の FACS 解析

FACS buffer に懸濁し、血球計算盤にて細胞数を 2.0×10^6 cells/100 µl に調整し FACS buffer に懸濁した。

(倫理面への配慮)

動物実験にあたっては、千葉大学動物委員会および国立感染症研究所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

CD3+B220+細胞の増加

SCG/Kj マウスでは、RPGN 発症に伴い CD3 と B220 を両方発現する細胞群が増加する。SCG/Kj マウスの RPGN 発症に伴う CD3+B220+細胞群の割合の変化を FACS により解析した。その結果、SCG/Kj マウスの脾臓中には、正常なマウスである C57BL/6 マウスには存在しない CD3+B220+細胞群が initial phase の段階から 10% 前後存在し、その割合は発症に伴い有意に増加することがわかった。この細胞群と MPO-ANCA との間には高い相関が新たに認められた (図 1)、さらにこの細胞群は、腎臓・リンパ節・肺にも存在した (図 2)。

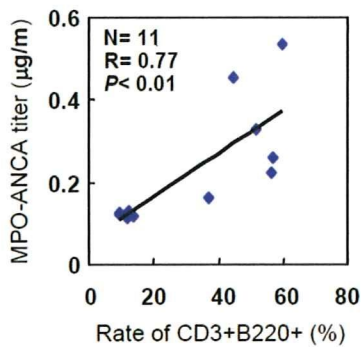


図1. CD3+B220+細胞群とMPO-ANCAとの高い相関

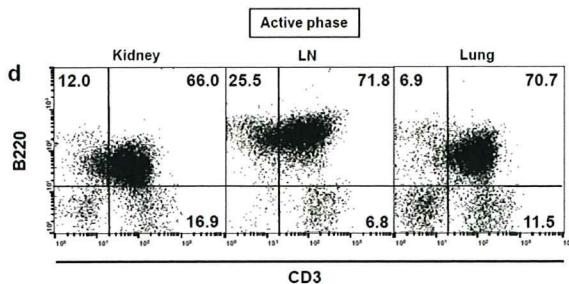


図2. 腎臓・リンパ節・肺でのCD3+B220+細胞群の存在

IL-6, および MCP-1 の病態との相関

RPGNの発症に関与サイトカイン、ケモカインの網羅的解析から、発症に伴って有意な増加が見られたのは、IL-4, IL-6, IL-10, IL-12(p40), G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , MCP-1, RANTESであった。これらのサイトカイン・ケモカインの内、IL-6およびMCP-1のみ、半月体形成率と有意な相関が認められた(図3)。

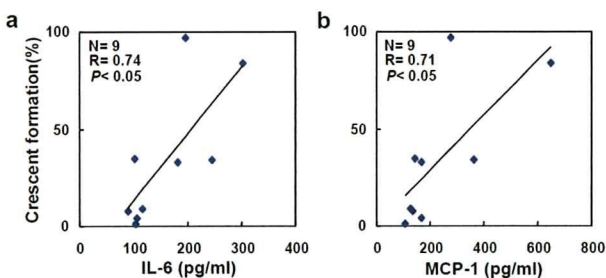


図3. IL-6、MCP-1の半月体形成率との相関

発症に伴うIL-6Rの増加

IL-6の受容体であるIL-6Rの腎臓における発現量と、血中における可溶性IL-6R(sIL-6R)の変化を解析した結果、糸球体においてinitial phase群には見られないIL-6Rの発現が、active phase群には顕著に認められた。血清中のsIL-6Rは、active phase群で有意な上昇が認められた(図4)。

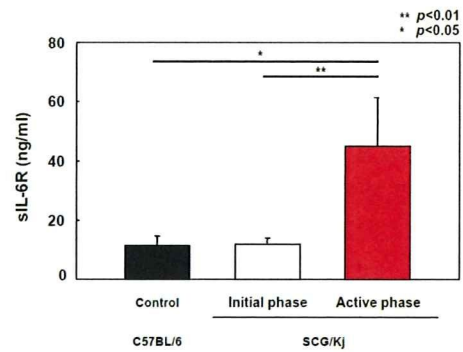
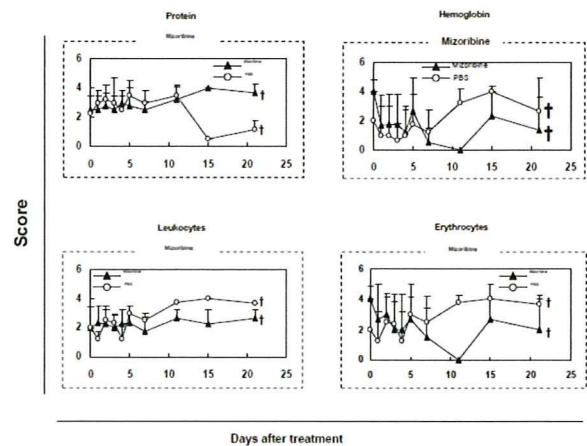


図4. Active phase群の有意なsIL-6Rの上昇

抗IL-6R抗体、ミゾリビンおよびDSGによる治療による尿所見の変化

- ・抗IL-6R抗体投与による尿所見の変化：対照群と比較して抗体投与群において各項目に緩和傾向が認められた。
- ・ミゾリビン投与による尿所見の変化：対照群と比較してミゾリビン投与群において尿所見の緩和傾向が認められた。(図5)。

図5. ミゾリビン投与時の尿所見の軽減



DSG投与による尿所見の変化

対照群と比較して、DSG投与群(0.02, 0.1 mg/mouse/day)では蛋白質、白血球において有意な緩和が認められ、血尿(ヘモグロビン・赤血球)においても緩和傾向が認められた。

・治療による病理組織の変化

ミゾリビン投与による組織の変化：ミゾリビン投与群において糸球体の腫大、血管周囲への炎症性細胞浸潤に若干の緩和傾向が認められた。

DSG投与による投与による組織の変化：DSG投与群においては、糸球体の腫大、炎症性細胞浸潤が抑制され、有意な半月体形成率の低下が認められた。

・治療によるMPO-ANCA値の変化

抗IL-6R抗体投与(週2回投与)により、抗体