

炎病変は内膜肥厚を伴って血管閉塞にまで至る。この系統でも、タンパク質 A に対する自己抗体の発現は加齢ともに上昇し、しかも雌に顕著であることがわかった。さらに、血管中膜平滑筋細胞において、タンパク質 A mRNA が高度に発現していたところから、抗タンパク質 A 抗体の発現は、この抗体の存在のみで血管炎の発症、進展プロセスを説明出来るものではないものの、血管炎の原因か結果に何らかのかたちで関与しているものと考えられる。

タンパク質 A は、最近、中膜平滑筋細胞 (SMC) の分化プロセスを阻害、制御していることが明らかにされた。従って、これに対する自己抗体の発現は、この抗体が細胞内で作用するとすれば、その結果として、SMC の分化を促進するものと考えられる。あるいは、血管炎で SMC が破壊され、その intrinsic epitope が露出する結果、この自己抗体が発現するのかもしれない。今後、血管炎の病理発生におけるこの自己抗体の意義についてさらに解析することは価値あるものと考えられる。

E. 結論

自己免疫病病理・病態を遺伝的に解離して発症するリコンビナントインブレッド系マウス MHX/lpr を用いて、AlphaScreen 法により 109 種類の合成タンパク質に対する自己抗体をスクリーニングする中で、高い反応性を示す自己抗体 4 種類を新たに選出し解析した。これ

らについての定量的解析を、無細胞系タンパク質合成法とリンクさせた capture ELISA 法を用いて行い、腎血管炎との高い相関を示す新規自己抗体リアクタントタンパク質 A を見出した。この抗体価は、血管炎好発系マウス McH5/lpr において、血管炎の発症に伴い上昇していた。このタンパク質 A mRNA は、MRL マウス由来血管中膜平滑筋細胞に高度に発現していた。タンパク質 A は、最近血管中膜平滑筋細胞の分化プロセスを阻害、制御するタンパク質であることが明らかになっており、これに対する自己抗体の発現は、血管炎発症・進展と関係している可能性が示唆された。

F. 研究発表

論文発表

1. 宮崎龍彦、能勢真人.: 全身性エリテマトーデス 第2章 病理・病態生理. 最新医学・別冊 新しい診断と治療の ABC 67 (別冊): 39-47, 2010.
2. Nose M.: A polygene network in collagen disease. Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi 33: 43-47, 2010.
3. 能勢真人.: 総説第3章 血管病変の成因と病理 B. 血管炎 5. 膠原病. 脈管専門医のための臨床脈管学 日本脈管学会編: 23-24, 2010.
4. Tanaka Y, Komori H, Mori S, Soga Y, Tsubaki T, Terada M, Miyazaki T, Fujino T, Nakamura S, Kanno H, Sawasaki T, Endo Y, Nose M. Evaluating the role of

rheumatoid factors in the development of rheumatoid arthritis in a mouse model with a newly established ELISA system. *Tohoku J Exp Med.* 220(3): 199-206, 2010.

5. Furukawa H, Tohma S, Kitazawa H, Komori H, Nose M, Ono M. Role of SLAM-associated protein in the pathogenesis of autoimmune diseases and immunological disorders. *Arch Immunol Ther Exp.* 58(1): 37-44, 2010.

6. Mizuki S, Oishi H, Zhang M-C, Kamogawa J, Miyazaki T, Ono M, Takahashi S, Yamamoto H, Nose M. Genetic heterogeneity in rheumatoid arthritis mouse models induced by extrinsic and intrinsic factors. *Pathology Int.* 60(6): 430-437, 2010.

7. Matsuoka K, Komori H, Nose M, Endo Y, Sawasaki T. Simple screening method for autoantigen proteins using the N-terminal biotinylated protein library produced by wheat Cell-Free synthesis. *J Proteome Res.* 9: 4264-4273, 2010.

8. Watanabe S, Takahashi T, Fujibuchi T, Komori H, Kamada K, Nose M, Yamamoto H. Synovial hemangioma of the knee joint in a 3-year-old girl. *J Pediatr Orthop B.* 19: 515-520, 2010.

学会発表

1. Miyazaki T, Tanaka Y, Kurata M, Ono

M, Nose M.: Allelic polymorphism of murine osteopontin implicates functional differences in antigen presentation by dendritic cells. 14th International Congress of Immunology, Aug. 23-27, 2010, Kobe, Japan.

2. Tanaka Y, Fujino T, Terada M, Ito M, Shudo M, Okabe M, Nose M.: A novel mouse model for primary focal segmental glomerulosclerosis developing associated with insertional mutagenesis by transgene. 14th International Congress of Immunology, Aug. 23-27, 2010, Kobe, Japan.

3. Kamao T, Miyazaki T, Soga Y, Komori H, Terada M, Nose M.: Common and different gene loci susceptible to sialoadenitis and dacryoadenitis in a sjögren's syndrome mouse model. 14th International Congress of Immunology, Aug. 23-27, 2010, Kobe, Japan.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

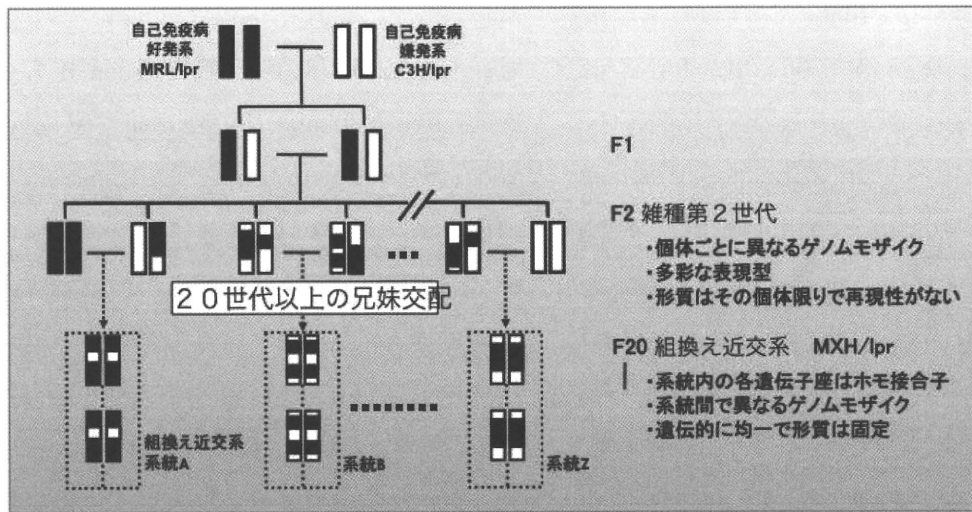


図1. 自己免疫病モデルマウス MRL/lpr の組換え近交系 (Recombinant Inbred strain) MXH/lpr の樹立

自己免疫病好発系の MRL/lpr マウスと嫌発系の C3H/lpr マウスを掛け合わせて得た F1 マウスは、両親系統由来の染色体をそれぞれ有するが、F2 では、個体ごとに異なるゲノムモザイクを持ち、多彩な表現型を示す。F2 では、形質はその個体限りで再現性がないため、20 世代以上の兄妹交配を繰り返し、その結果、系統間で異なるゲノムモザイクを示し、しかも系統内の各遺伝子座はホモ接合体になり、遺伝的に均一で形質は固定される。この MXH/lpr マウスは系統間の遺伝的多様性と各系統内の遺伝的均一性を併せ持つ。

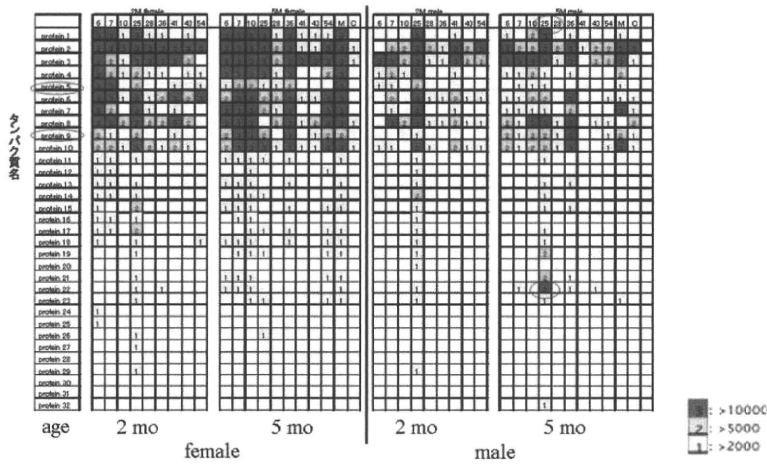


図2. AlphaScreen 法による MXH/1pr 各系統の自己抗体のスクリーニング

縦軸にタンパク質名、横軸に系統名 MXH/1pr、MRL/1pr (M)、C3H/1pr (C) と雌雄、血液採取時期 (月齢) を示す。系統、時期によって様々な自己抗体が出現し、系統特異的に発現する抗体も存在する。右下の値は AlphaScreen による測定強度を意味する。

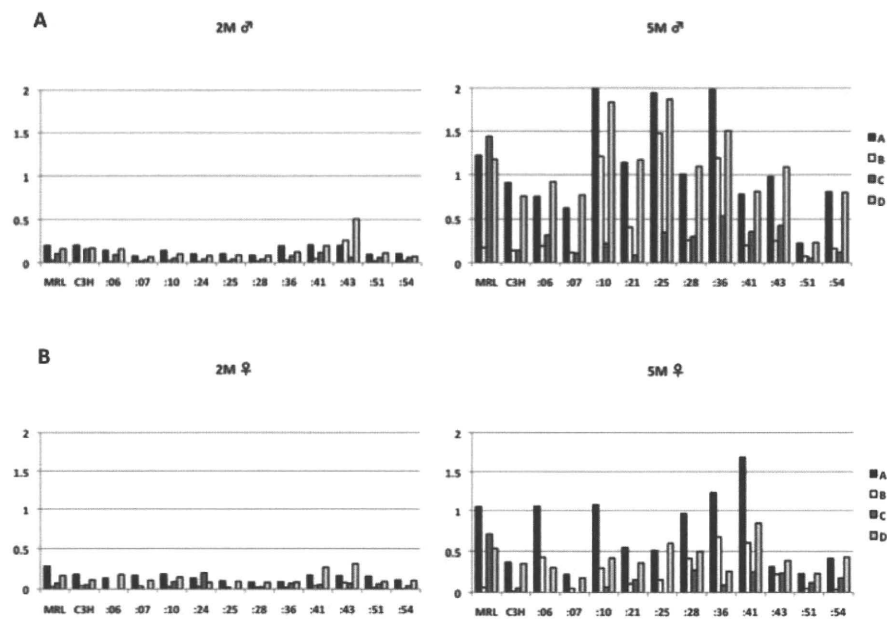


図3. AlphaScreen 法で高値を示した自己抗体リアクタントタンパク質の capture ELISA 法による定量

横軸は MRL/pr、C3H/1pr、ならびに MXH/1pr 系統名、雌雄、血液採取時期 (月齢) を示す。右端 A, B, C, D はそれぞれタンパク質 A, B, C, D を意味する。

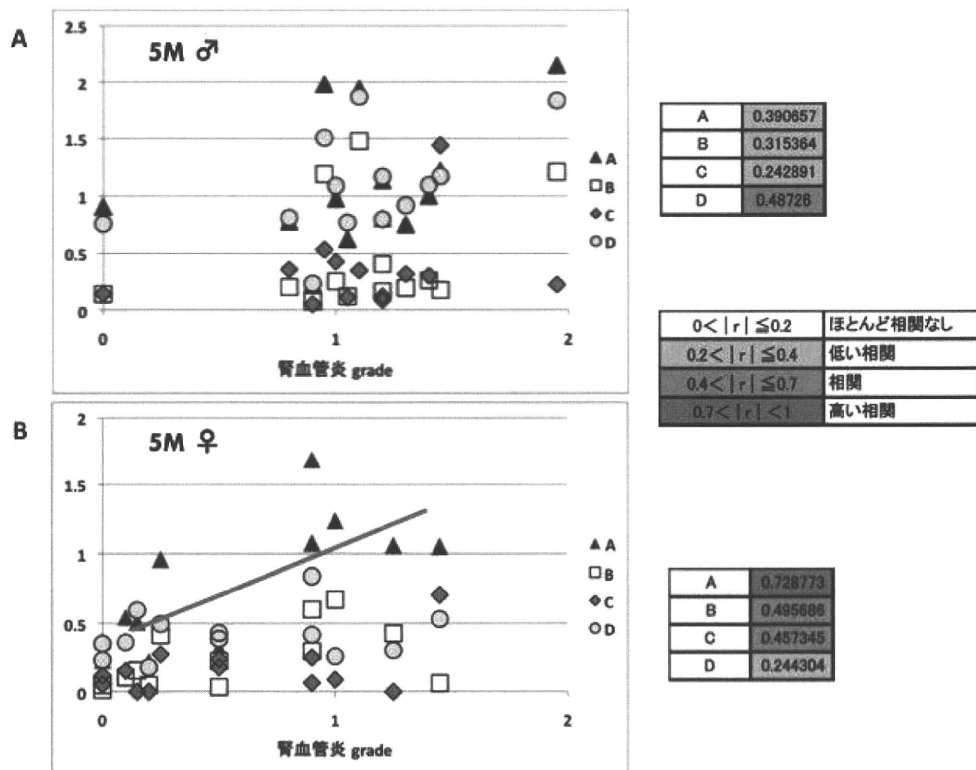


図4. MXH/lpr マウスにおける腎血管炎と抗 A, B, C, D タンパク質抗体との相関解析
ELISA での測定値 (縦軸) と腎血管炎の組織病理グレード (横軸) についてスピアマンの順位相関係数を使った相関性を示す。5 ヶ月齢の雌においてタンパク質 A に対する自己抗体価は、腎血管炎のグレードと高い相関を示した ($0.7 < |r| < 1$) (斜線)。本文参照。

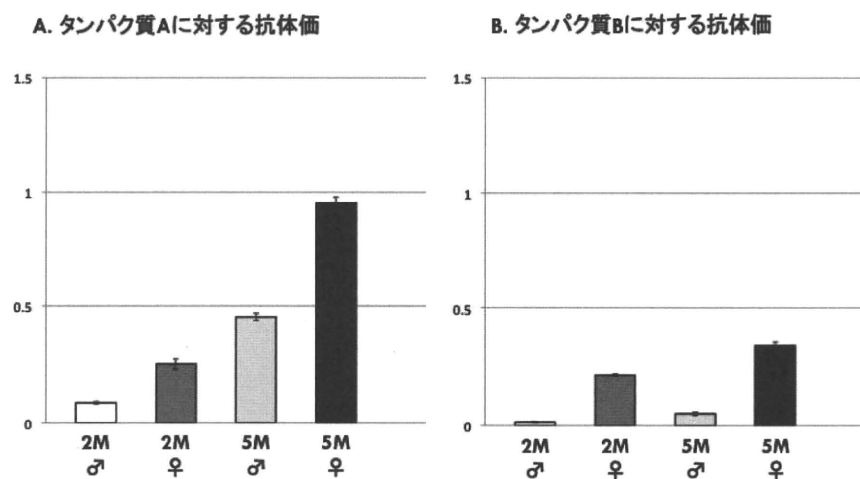


図5. 血管炎好発系 McH5/1pr マウスにおけるタンパク質 A, B に対する抗体価
タンパク質 A に対する自己抗体は、早期 2 ヶ月齢から上昇し、雌において顕著であった。タンパク質 B でも同様の傾向が見られたが、抗体価の上昇は顕著ではなかった。

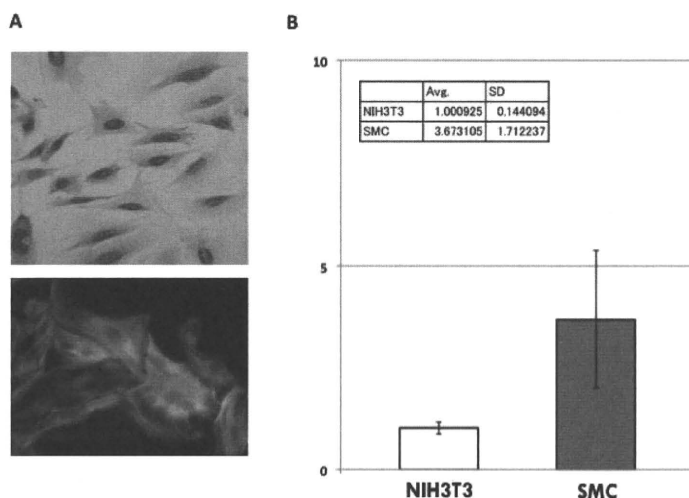


図6. タンパク質 A の血管中膜平滑筋細胞における mRNA の発現量

- A. MRL マウス由来の血管中膜平滑筋細胞培養株 MRL/S-2。下段は抗 SMA 抗体陽性所見を示す。
- B. タンパク質 A mRNA の発現量の MRL/S-2 細胞とマウス線維芽細胞培養株 NIH3T3 との比較。MRL/S-2 細胞では NIH3T3 細胞の約 3 倍の発現量を示した。

血管炎の発症機序解明と新しい病態診断法の開発に関する研究

研究分担者 北海道大学大学院保健科学研究院 石津明洋

研究要旨

中・小型血管に血管炎を発症する env-pX ラットから自己血管内皮細胞反応性 T 細胞を単離した。単離した T 細胞は、TCR $\alpha\beta^+$ CD3 $^+$ CD4 $^+$ CD8 $^+$ CD25 $^+$ NKR-P1A $^-$ の形質を有する double negative T 細胞であった。TCR V β 鎖は V β 8.6 を用い、CDR3 領域のアミノ酸配列は RPWGGRF であった。この T 細胞のサイトカイン/ケモカインプロファイルを解析したところ、IL-2(-), IL-4(+), IL-10(-), IL-17(-), IFN- γ (+), MCP-1(+), MIP-1 α (+), MIP-1 β (+), rantes(+), eotaxin(-)を示した。この T 細胞を野生型ラットに静注することにより、肺その他の組織に血管炎が誘導されたことから、単離した自己血管内皮細胞反応性 T 細胞は血管炎惹起性 T 細胞であると考えられた。

また、MPO-ANCA 関連血管炎患者の治療前および治療開始 1 週間後の末梢血を用いて、網羅的遺伝子発現解析を行った。治療後に寛解が導入され、その後も寛解が維持された 9 症例について 8,793 個の遺伝子を解析し、治療前後で有意な発現変化を示す 88 個の遺伝子を抽出した。次に、抽出された 88 遺伝子の中から再現性の確認された 30 遺伝子を選定して、定量的遺伝子発現解析を行った。この解析に供した症例は 18 症例であり、その内訳は、予後良好群（寛解維持）15 例、予後不良群 3 例（寛解後再燃 2 例、非寛解死亡 1 例）であった。この 18 症例をトレーニングサンプルとして治療後の予後との関連について重回帰分析を行い、治療開始後 1 週間の時点でその後の予後を予測する最適な遺伝子セットを検討した結果、16 個の遺伝子が抽出された。治療前と治療開始 1 週間後の末梢血を用いて、抽出された 16 個の遺伝子の発現変化を調べることにより、MPO-ANCA 関連血管炎患者の治療後の予後を予測できる可能性が示された。

A. 研究目的

モデル動物を用いて血管炎の発症機序を解明し、血管炎の新しい分子標的治療法の開発につなげる。また、MPO-ANCA 関連血管炎患者の末梢血を用いて、本疾患の病態や予後に関連する遺伝子群を明らかにし、本疾患の新しい病態診断法を開発する。

B. 研究方法

中・小型血管に血管炎を発症する env-pX ラットから抽出した自己血管内皮細胞反応性細胞株 PC4 から、限界希釈法により自己血管内皮細胞反応性 T 細胞を単離し、そのフェノタイプと血管炎惹起性を解析した。

MPO-ANCA 関連血管炎患者の治療前および治療開始後 1 週間の末梢血を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行い、重症度や治療後の予後との相関を検討した。

（倫理面への配慮）

動物実験は北海道大学の動物実験指針に基づいて行った。

患者検体の採取にあたっては、文部科学省・厚生労働省・経済産業省の掲げる遺伝子解析研究に関する倫理指針に基づき、各々の検体採取機関の倫理委員会の承認を受け、全例インフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

PC4 から限界希釈法により 3 つの T 細胞クローン（1B8, 4E1, 4D6）を得た。3 つのクローンは、いずれも TCR $\alpha\beta^+$ CD3 $^+$ CD4 $^+$ CD8 $^+$ CD25 $^+$ NKR-P1A $^-$ の形質を有する double negative T 細胞であった。また、TCR V β 鎖は V β 8.6 を用い、CDR3 領域のアミノ酸配列は RPWGGRF を示す同一のクローンであった。この T 細胞クローン

のサイトカイン/ケモカインプロフィールを RT-PCR で解析したところ、IL-2(-), IL-4(+), IL-10(-), IL-17(-), IFN- γ (+), MCP-1(+), MIP-1 α (+), MIP-1 β (+), rantes(+), eotaxin(-)を示した。この T 細胞クローンを野生型ラットに静注することにより、肺その他の組織に血管炎が誘導された。

治療後に寛解が導入され、その後も寛解が維持された MPO-ANCA 関連血管炎 9 症例について、Affymetrix 社 gene chip を用いて 8,793 個の遺伝子を解析し、治療前後で有意な発現変化を示す 88 個の遺伝子を抽出した。次に、抽出された 88 遺伝子の中から再現性の確認された 30 遺伝子を選定して、Applied Biosystems 社 TaqMan Low Density Array による定量的遺伝子発現解析を行った。この解析に供した症例は 18 症例であり、その内訳は、予後良好群 (寛解維持) 15 例、予後不良群 3 例 (寛解後再燃 2 例、非寛解死亡 1 例) であった。この 18 症例をトレーニングサンプルとして治療後の予後との関連について重回帰分析を行い、治療開始後 1 週間の時点でその後の予後を予測する最適な遺伝子セットを検討し、16 個の遺伝子を抽出した。

D. 考察

本研究において単離した自己血管内皮細胞反応性 T 細胞は血管炎惹起性 T 細胞であると考えられた。この T 細胞クローンの認識分子を同定することにより、血管炎の標的分子を明らかにすることができると考えられる。

MPO-ANCA 関連血管炎患者の治療前と治療開始 1 週間後の末梢血を用いて、本研究により抽出された 16 個の遺伝子の発現変化を調べることにより、MPO-ANCA 関連血管炎患者の治療後の予後を予測できる可能性が示された。抽出された 16 個の遺伝子のうち 13 個は治療後に発現が低下する遺伝子で、その中には IFN-induced protein with tetratricopeptide repeats (IFIT) ファミリーや IFN-induced helicase (IFIH) ファミリー、2'-5'-oligoadenylate synthetase (OAS) ファ

ミリーの遺伝子や、guanylate binding protein 1 (GBP1) といった 1 型インターフェロン関連遺伝子、ならびに CD36 や chemokine (C-C motif) receptor 3 (CCR3) といった受容体の遺伝子が含まれており、これらは MPO-ANCA 関連血管炎の病態増悪因子と考えられた。一方、16 個中 3 個は治療後に発現が増加する遺伝子で、そのうち 2 個は defensin ファミリーの遺伝子であった。Defensin の発現増加がどのような意義を持つかについては、今後の検討課題である。

E. 結論

中・小型血管に血管炎を発症する env-pX ラットから、自己血管内皮細胞に反応し血管炎を惹起する T 細胞クローンを樹立した。樹立した T 細胞クローンは TCR $\alpha\beta^+$ CD3 $^+$ CD4 $^+$ CD8 $^-$ CD25 $^+$ NKR-P1A $^-$ の形質を有する double negative T 細胞であった。今後、この T 細胞クローンの認識分子を同定することにより、血管炎の標的分子を明らかにすることができると考えられる。また、自己血管内皮細胞反応性 T 細胞が出現するメカニズムや同 T 細胞による血管炎発症メカニズムを明らかにすることにより、血管炎の新しい分子標的治療法の開発が可能になると考えられる。

MPO-ANCA 関連血管炎患者の末梢血トランスクリプトーム解析を行い、治療前と治療開始 1 週間後の末梢血を用いて 16 個の遺伝子の発現変化を調べることにより、治療後の予後を予測できる可能性を示した。治療開始後の早期に予後を予測することにより、予後不良と予測された場合には嚴重な経過観察や付加的な治療を行うことで、その症例の予後の改善が期待できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ishizu A, Abe A, Miyatake Y, Baba T, Iinuma C, Tomaru U, Yoshiki T. Cyclic AMP response element binding protein is implicated in IL-6 production from

- arthritic synovial cells. *Mod Rheumatol* 20: 134-138, 2010.
- 2) Takahashi S, Kamiyama T, Tomaru U, Ishizu A, Shida T, Osaka M, Sato Y, Saji Y, Ozaki M, Todo S. Frequency and pattern of expression of the stem cell marker CD133 have strong prognostic effect on the surgical outcome of colorectal cancer patients. *Oncol Rep* 24: 1201-1212, 2010.
 - 3) 石津明洋, 外丸詩野, 村井太一, 山本智宏, 吉木 敬. トランスクリプトミクスによる血管炎関連因子の探索. *炎症と免疫* 18: 509-513, 2010.
 - 4) Iwasaki S, Masuda S, Baba T, Tomaru U, Katsumata K, Kasahara M, Ishizu A. Plasma-dependent, antibody- and Fcγ receptor-mediated translocation of CD8 molecules from T cells to monocytes. *Cytometry A* 79A: 46-56, 2011.
 - 5) Furuya M, Nagahama K, Ishizu A, Otsuka N, Nagashima Y, Aoki I. Complexity of tumor vasculature and molecular targeting therapies. *Front Biosci (Elite Ed)* 3:549-61, 2011.
 - 6) Shinohara N, Takahashi M, Kamishima T, Ikushima H, Otsuka N, Ishizu A, Sazawa A, Kanayama H, Nonomura K. The incidence and the mechanism of sunitinib-induced thyroid atrophy in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Br J Cancer* (in press)
2. 学会発表
 - 1) Ozaki S, Makino H, Tomino Y, Yumura W, Yamagata K, Yamada H, Kumagai S, Ishizu A, Kurokawa M, Suka M, Nagafuchi H. First prospective trial, JMAAV, in Japanese patients with MPO-ANCA-associated vasculitis. 14th International Congress of Immunology, Kobe, 2010.
 - 2) Iwasaki S, Masuda S, Baba T, Katsumata K, Tomaru U, Kasahara M, Ishizu A. Serum-dependent, antibody and Fcγ receptor-mediated translocation of CD8 molecules from T cells to monocytes. 14th International Congress of Immunology, Kobe, 2010.
 - 3) Tomaru U, Suzuki S, Ishizu A, Takahashi S, Ohara J, Miyatake Y, Murata S, Tanaka K, Kasahara M. Skewed T cell development in mice with ectopic expression of thymoproteasome. 14th International Congress of Immunology, Kobe, 2010.
 - 4) 石津明洋, 外丸詩野, 吉木 敬. 血管炎惹起性 T 細胞クローンの樹立と解析. 第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 神戸, 2010.
 - 5) 石津明洋, 外丸詩野, 吉木 敬, 湯村和子, 山縣邦弘, 山田秀裕, 熊谷俊一, 黒川真奈絵, 須賀万智, 尾崎承一. JMAAV トランスクリプトーム解析. 第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 神戸, 2010.
 - 6) 高桑由希子, 黒川真奈絵, 大岡正道, 湯村和子, 山縣邦弘, 山田秀裕, 熊谷俊一, 石津明洋, 須賀万智, 尾崎承一, 加藤智啓, 増子佳世. 顕微鏡的多発血管炎患者血清ペプチドの網羅的検索. 第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 神戸, 2010.
 - 7) 須賀万智, 永渕裕子, 湯村和子, 山縣邦弘, 山田秀裕, 熊谷俊一, 石津明洋, 黒川真奈絵, 尾崎承一. MPO-ANCA 関連血管炎における疾患活動性と QOL への影響. 第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 神戸, 2010.

- 8) 飯沼千景, 脇 雅, 山口まどか, 佐々木直美, 外丸詩野, 石津明洋. 血管炎惹起性 T 細胞クローンの樹立と解析. 第 99 回日本病理学会総会, 東京, 2010.
- 9) 益田紗季子, 岩崎沙理, 馬場智久, 勝俣一晃, 外丸詩野, 笠原正典, 石津明洋. ヒト末梢血に検出される CD8 陽性単球・顆粒球の解析. 第 99 回日本病理学会総会, 東京, 2010.
- 10) 鈴木小百合, 外丸詩野, 高橋里実, 小原次郎, 風巻 拓, 小野綾子, 宮武由甲子, 村田茂穂, 田中啓二, 石津明洋, 笠原正典. 胸腺プロテアソームの異所性発現による T 細胞分化の異常. 第 99 回日本病理学会総会, 東京, 2010.
- 11) 高橋里実, 外丸詩野, 鈴木小百合, 小野綾子, 宮武由甲子, 風巻 拓, 小原次郎, 村田茂穂, 田中啓二, 石津明洋, 笠原正典. プロテアソームの機能異常による病理作用. 第 99 回日本病理学会総会, 東京, 2010.
- 12) 深谷進司, 外丸詩野, 松井由希, 保田晋介, 堀田哲也, 片岡 浩, 渥美達也, 小池隆夫, 笠原正典, 石津明洋. TNF- α 変換酵素 (TACE) トランスジェニックマウスの解析. 第 99 回日本病理学会総会, 東京, 2010.
- 13) 山田洋介, 外丸詩野, 木内隆之, 丸川活司, 笠原正典, 石津明洋, 松野吉宏. プロテアソームサブユニット $\beta 5t$ の胸腺腫における発現. 第 99 回日本病理学会総会, 東京, 2010.
- 14) 木内隆之, 外丸詩野, 高田明生, 石津明洋. von Recklinghausen 病による動脈破裂の病理組織学検討. 第 99 回日本病理学会総会, 東京, 2010.
- 15) 木内隆之, 外丸詩野, 高田明生, 石津明洋. von Recklinghausen 病による動脈破裂の病理組織学検討. 第 15 回血管病理研究会, 東京, 2010.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許出願
該当なし。
 2. 実用新案登録
該当なし。
 3. その他
該当なし。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

難治性血管炎に関する調査研究

分担研究報告書

MPO-ANCA 関連血管炎モデルマウスの

MPO 抗体の血管内皮細胞標的分子を Moesin と同定

—新規マーカーとしての Anti-Moesin 抗体の可能性—

研究分担者 千葉大学大学院医学研究院 免疫発生・炎症制御 鈴木和男

研究協力者 東邦大医療センター大橋病院病理 高橋 啓

千葉大学大学院医学研究院 免疫発生・炎症制御 長尾朋和

協 力：自治医大・腎臓内科 湯村和子

研究要旨

MPO-ANCA エピトープによる血管内皮細胞障害機構を明らかにする目的で、マウス糸球体血管内皮細胞(mGEC)に MPO-ANCA の標的分子として MPO 以外の分子が存在することを報告した (NDT, 2007)。mGEC から本分子を単離し PMF 解析し moesin と同定した(NDT, 2011)。Moesin には、MPO-ANCA のリスクエピトープ部位の MPO の N 末端部分と相同な構造が含まれていた。これらマウスから得られた知見である moesin について、MPO-ANCA 関連血管炎との関係を調べた。まず、moesin 抗体が MPO-ANCA 患者血清中に存在するかを ELISA およびウエスタンブロットにより確認した。次いで、MPO-ANCA 患者血清中の moesin 抗体と MPO-ANCA 値の関係を解析するための moesin 抗体価の定量の ELISA 測定系を確立した。今後は、血管炎患者血清に存在する 2 つの抗体と病態との関係を解明する。これは、マウスでの基礎研究の成果が臨床研究に生かされることを意味している。

A. 研究目的

顕微鏡的多発性血管炎モデルマウスは、NZB/BF1、MRL/lpr や SCG/Kj などの自然発症マウスが報告されている。中でも SCG/Kj マウスは、半月体形成糸球体腎炎を高率かつ急速に自然発症する。腎炎発症と共に SCG/Kj マウスは、MPO-ANCA 力価の増加、リンパ節の腫脹が認

められ MPO-ANCA、好中球機能が関与していることを示すモデルマウスである。SCG/Kj マウスは、われわれの研究によって、SCG/Kj マウス腎炎発症初期に MPO の放出能が、C57BL/6 マウスより高値で、MPO-ANCA 力価、好中球中の MPO が血管炎に関与していることが示唆された。

また、我々は、MPO 抗原が存在しない糸球体血管内皮に、抗 MPO 抗体が直接反応することを示した。マウスの糸球体内皮細胞である mGEC を単離することに成功し、mGEC に抗 MPO 抗体を反応させることで、ICAM-1、VCAM-1 などの走化性因子や白血球接着因子である E-selectin の発現が、増加していることを示した。また、抗 MPO 抗体特異的反応であることを証明するため、mGEC をコントロール IgG と抗 MPO 抗体各々で免疫染色を行い、コントロール IgG で抗体の沈着は認められなかったが、抗 MPO 抗体では、mGEC との反応性が認められた。また、この反応が抗 MPO 抗体の特異的反応であるという結果をさらに追証するため、抗 MPO 抗体を MPO によって事前に吸着させた抗体を用いて、mGEC を刺激したときの ICAM-1 発現を比較した。MPO によって抗 MPO 抗体を吸着させることで、ICAM-1 の発現量は有意に低下したことより、MPO を認識する抗体が mGEC と反応することが明らかになった。mGEC には、MPO は含まれておらず、MPO-KO マウス由来の血清を使った培養液と MPO-KO マウス由来の糸球体血管内皮細胞を使った MPO 完全フリーの実験により、抗 MPO 抗体が MPO 以外の分子と反応していることが確認されていた(NDT, 2007)。ことから MPO

抗体の mGEC 中の標的分子を同定することが必須であった。

本研究では、マウスの糸球体内皮細胞 mGEC において、抗 MPO 抗体と交差反応性を示す分子を証明することとした。また、MPO-ANCA 関連血管炎患者において、患者血中の MPO-ANCA が本分子と交差反応性を示すかを明らかにすることも目的とした。

B. 研究方法

MPO 抗体が反応する糸球体血管内皮細胞分子の同定

mGEC ライゼートの2次元ウエスタンブロットで分子を特定し、そのスポットを PMF 解析した。
ウエスタンブロット: SDS-PAGE 後、1 時間タンパクを PVDF メンブレンに転写させた。このメンブレンを 1% Casein bovine milk/TBST(0.05% Tween20) 4℃で一晩静置しブロッキングし、希釈バッファーで抗マウス IgG を 10,000 倍、MPO 抗体で反応させ、ECL 試薬で 1 分間反応させ、10 秒間感光させた後現像した。

Anti-moesin 抗体測定法(ELISA)の確立

リコンビナント moesin を 96 穴プレートにコートし、健常人血清を加え 1.5 時間室温に静置し反応させた。二次抗体として AP 標識抗ヒト IgG を加え、1.5 時間室温で静置し反応させた。AP 基質

緩衝液に p-NPP で反応させ 405 nm ref-650 nm で吸光度を測定した。

MPO-ANCA 関連血管炎患者血清中の抗 moesin 抗体の標的分子の確定

健康者および MPO-ANCA 陽性患者からへパリン採血し、多形核白血球(好中球:PMN)および単核球(PBMC)を分離し、RIPA buffer にて細胞ライゼートとした。リコンビナント moesin (7 µg/ml)、PMN (1 mg/ml)、PBMC (1 mg/ml) となるようにそれぞれ調製し、ゲルの各ウェルに分子量マーカーを 5 µL、サンプル 15 µL ずつ注ぎ、free A、200V 定電圧で 40 分間電気泳動を行った。次いで、ウエスタンブロットにより抗体の反応性を検討した。

(倫理面への配慮)

患者の血液・血清の使用に当たっては、千葉大学医学研究院の倫理委員会(以下「委員会」)規定に従って申請・許可を得た。具体的には、患者の検体は、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」の許可を得て実施した。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、動物実験計画書を千葉大学の動物委員会の許可を得て、動物愛護のもとに研究を実施した。

C. 研究結果

MPO 抗体が反応する mGEC 分子を moesin と同定

mGEC ライゼートのウエスタンブロットで分子を確認(図1A. B)し、そのスポットを PMF 解析した。その結果、moesin であることが明らかになった。

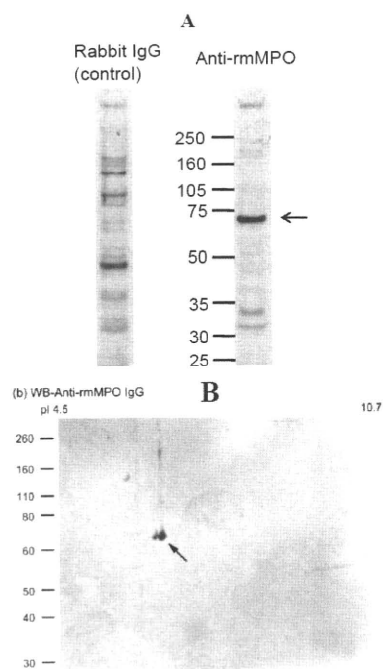


図1. mGEC ライゼートのウエスタンブロット

ELISA による Anti-moesin 抗体測定法の確立

MPO-ANCA 陽性患者の血清中の抗 moesin 抗体価を ELISA により測定した。対照群として健康人ボランティア血清と比較した。健康人と比較して、MPO-ANCA 陽性患者で血清中の抗

moesin 抗体価が、有意に高値であることが認められた(図2)。抗 moesin 抗体陽性は、健康人血清抗 moesin 抗体価(Units/ml)の平均値+2SDを基準値(54.2 Units/ml)とした。

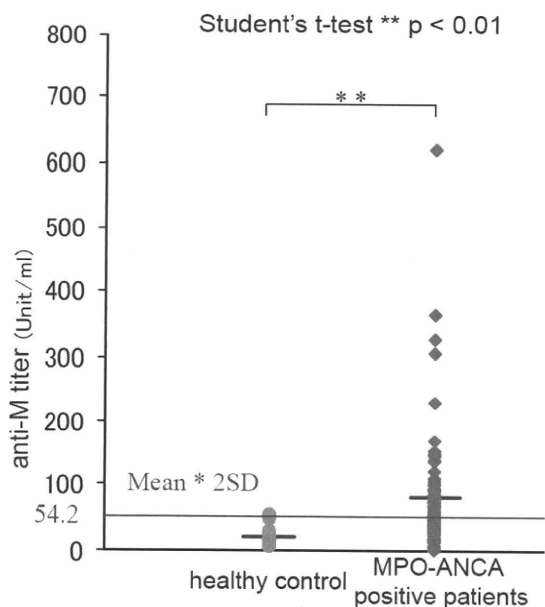


図2. MPO-ANCA 陽性患者血清中の抗 moesin 抗体価

MPO-ANCA 関連血管炎患者血清中の抗 moesin 抗体の標的分子を moesin と確定

ELISA 法を用いて抗 moesin 抗体価が、MPO-ANCA 陽性患者において高値であることを示したが、MPO-ANCA 陽性患者血清が moesin を認識しているかを確認するためウエスタンブロット法で調べた。一次抗体反応に患者血清、健康人血清、またポジティブコントロールとしてモノクローナル抗体を用いて解析した。患者血清により

コンビナント moesin (89.5kDa)にシングルバンドが認められた(図3)。さらに、ヒト由来の試料である PMN、PBMC の細胞ライゼートにおいても、ポジティブコントロール同様の native moesin(67.8kDa)のバンドが認められた。一方、健康人血清を一次抗体として用いた場合、リコンビナント moesin、native moesin のバンドは共に認められなかった。尚、リコンビナント moesin の分子量が moesin より大きい理由は moesin タンパクに GST タグが結合していることに起因する。以上のことから、MPO-ANCA 陽性患者血中に抗 moesin 抗体の存在が認められた。

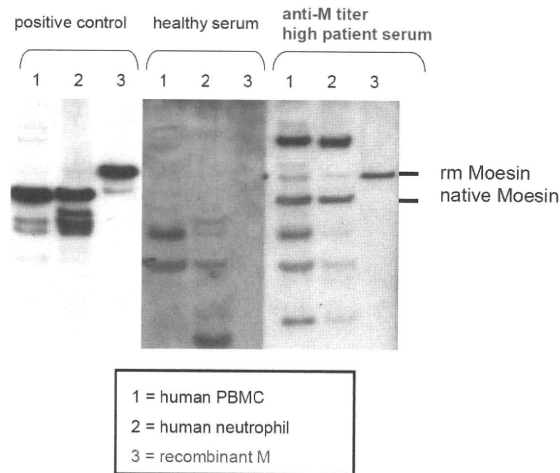


図3. MPO-ANCA 関連血管炎患者血清中の抗 moesin 抗体の存在確定

C. 考察

MPO-ANCA 関連血管炎は、血清中の自己抗体である MPO-ANCA が陽性であり、病理組織

学的に半月体形成腎炎を呈することを特徴とする。MPO-ANCA は、臨床診断マーカーとして用いられているが、その力価と病態が関連しない場合もあり、新規診断法の開発を含め傷害誘導メカニズムの解明が急務とされている。本研究で、はじめて、抗 MPO 抗体がマウス糸球体血管内皮細胞の moesin と反応し、そのモデルマウスで示された結果と同様、MPO-ANCA が moesin と交差反応性を示すか明らかになった。

また、抗 moesin 抗体価の測定系を確立し、MPO-ANCA 関連血管炎患者血清を測定したところ、健常人と比較して、有意に抗 moesin 抗体が高いことが認められた。

さらに、MPO-ANCA 関連血管炎患者において、本抗 moesin 抗体が PMN、単球と反応が明らかになった。これらのことから、抗 moesin 抗体価が MPO-ANCA 関連血管炎の新しい診断マーカーとしての有用性が示唆された。

E. 結論

MPO-ANCA 関連血管炎は、臨床診断マーカーとして用いられているが、その力価と病態が関連しない場合もあり、新規診断法の開発を含め傷害誘導メカニズムの解明が急がれていた。これまで、我々は、マウス糸球体血管内皮細胞に MPO-ANCA の標的分子として MPO 以外の

分子が存在することが報告してきたが (NDT, 2007)。本研究での PMF 解析により moesin と同定した。この部分は、MPO-ANCA のリスクエピトープ部位が含まれていた。本研究により抗 MPO 抗体がマウス糸球体血管内皮細胞の moesin と反応することが認められるとともに、MPO-ANCA 関連疾患炎の患者血清中に抗 moesin 抗体の存在が確認された。このことから、抗 moesin 抗体新血清マーカーとしての有用性の可能性を示した。これは、マウスでの基礎研究の成果が臨床研究に生かされることを意味している。

今後は、病態と本抗体価との関係を解明する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) T. Nagao, K. Suzuki, K. Utsunomiya, M. Matsumura, K. Saiga, P-C. Wang, H. Minamitani, Y. Aratani, T. Nakayama, K. Suzuki. Direct activation of glomerular endothelial cells by anti-moesin activity of anti-myeloperoxidase antibody. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2011; in press.
- 2) T. Aoyagi, N. Yamamoto, M. Hatta, D. Tanno, A. Miyazato, K. Ishii, K. Suzuki, T. Nakayama, M. Taniguchi, H. Kunishima,

- Y. Hirakata, M. Kaku, K. Kawakami. Activation of pulmonary invariant NKT cells lead to exacerbation of acute lung injury caused by lipopolysaccharide through local production of IFN- γ and TNF- α by Gr-1+ monocytes. *International Immunol.* in press, 2010.
- 3) S. Kobayashi, S. Fujimoto, K. Takahashi, K. Suzuki. [Review] ANCA-associated vasculitis, large vessel vasculitis and Kawasaki disease in Japan. *Kidney Blood Press Res* 2010; 33:442-455
- 4) Tomizawa K, Nagao T, Kusunoki R, Saiga K, Oshima M, Kobayashi K, Nakayama T, Tanokura M, Suzuki K. Reduction of MPO-ANCA epitopes in SCG/Kj mice by 15-Deoxyspergualin treatment restricted by IgG2b associated with crescentic glomerulonephritis *Rheumatology (Oxford)*. 2010; Jul;49:1245-56.
- 5) K. Takahashi, T. Oharaseki, N. Nagai-Miura, N. Ohno, A. Ishida-Okawara, H. Yamada, Y. Kaneshiro, S. Naoe, K. Suzuki. Administration of human immunoglobulin inhibited development of vasculitis in a murine model of vasculitis induced with CAWS, *Candida albicans* water soluble fraction. *Modern Reumatol.* 2010; 20:160-167
- 6) Basu N, Watts R, Bajema I, Baslund B, Bley T, Boers M, Brogan P, Calabrese L, Cid MC, Cohen-Tervaert JW, Flores-Suarez LF, Fujimoto S, de Groot K, Guillevin L, Hatemi G, Hauser T, Jayne D, Jennette C, Kallenberg CG, Kobayashi S, Little MA, Mahr A, McLaren J, Merkel PA, Ozen S, Puechal X, Rasmussen N, Salama A, Salvarani C, Savage C, Scott DG, Segelmark M, Specks U, Sunderkötter C, Suzuki K, Tesar V, Wiik A, Yazici H, Luqmani R: EULAR points to consider in the development of classification and diagnostic criteria in systemic vasculitis. *Ann Rheum Dis* 69(10):1744-50, 2010
- 7) Kobayashi S, Fujimoto S, Takahashi K, Suzuki K: Anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis, large vessel vasculitis and Kawasaki disease in Japan. *Kidney Blood Press Res* 33:442-455, 2010
- 8) Suzuki Y, Takeda Y, Sato D, Kanaguchi Y, Tanaka Y, Kobayashi S, Suzuki K, Hashimoto H, Ozaki S, Horikoshi S, Tomino Y. Clinicoepidemiological manifestations of RPGN and ANCA-associated vasculitides: an 11-year retrospective hospital-based study in Japan. *Mod Rheumatol.* 20:54-62,2010.

2. 学会発表

国内学会

- 1) 小林茂人、藤元昭一、鈴木和男
EULAR/ACRによる新しい血管炎の分類基準・診断基準作成について 第99回日本病理学会総会、2010年4月27-29日、東京
- 2) 大原関利章、横内 幸、儘田 洋、伊原文恵、山田仁美、武藤里志、三浦典子、大野尚仁、佐地 勉、長尾朋和、鈴木和男、定本清美、高橋 啓 川崎病類似マウス動脈炎モデルにおける抗 TNF- α 製剤の動脈炎抑制効果の検討 その2- 第99回日本病理学会総会、2010年4月27-29日、東京
- 3) 感染症誘発の肺障害にかわるサイトカイ

- ン・ケモカインの網羅的解析 感染研・村山セミナー2010年5月24日、東京
- 4) 長尾朋和、鈴木浩也、王 碧昭、荒谷康昭、菅又龍一、中山俊憲、鈴木和男 MPO-ANCA 関連血管炎モデルにおける LPS の役割 第 21 回日本生体防御学会、2010年7月21-23日、仙台
 - 5) 小浦美奈子、島 かおる、中村和臣、野口洋子、鈴木 治、鈴木和男、亀岡洋祐、松田潤一郎 急速進行性糸球体腎炎モデル SCG/ThpNkc マウスの繁殖及び腎炎の発症状況について 第 44 回日本実験動物技術者協会総会で、2010年9月3-4日、旭川
 - 6) 鈴木 和男 ワークショップ：血管炎発症のメカニズム：ANCA と好中球ライソゾーム酵素 MPO の関与 第 40 回腎臓東部学術大会、2010年9月24-25日、宇都宮
 - 7) 鈴木和男 プライマリーケア医が血管炎を見つける！第2回 血管炎の国際情報普及フォーラム 2010年10月7日、広島
 - 8) 高橋 啓、大原関利章、長尾朋和、富澤一夫、横内 幸、山田仁美、大野尚仁、佐地勉、岡崎富男、鈴木和男 川崎病類似マウス血管炎誘発モデルにおける Mizoribin の有効性についての検討 第 30 回日本川崎病学会、2010年10月10-11日、京都
 - 9) 大原関利章、横内 幸、儘田 洋、武藤里志、三浦典子、大野尚仁、佐地 勉、鈴木和男、定本清美、高橋 啓 川崎病類似マウス血管炎モデルにおける抗 TNF- α 療法の血管炎抑制効果 第 30 回日本川崎病学会、2010年10月10-11日、京都
 - 10) 鈴木 和男 ミニレクチャー I 「ベトナムにおける川崎病」 第 16 回 MPO 研究会、2011年1月28-29日、仙台
 - 11) 村上央、三浦典子、安達禎之、石橋健一、埜晴雄、相澤義房、鈴木和男、大野尚仁、GM-CSF 遺伝子導入マウスの CAWS 急性致死毒性 第 16 回 MPO 研究会、2011年1月28-29日、仙台
 - 12) 高橋 啓、大原関利章、長尾朋和、富澤一夫、横内 幸、山田仁美、大野尚仁、佐地 勉、岡崎富男、鈴木和男 川崎病類似マウス血管炎モデルにおける Mizoribin の有効性 第 16 回 MPO 研究会、2011年1月28-29日、仙台
 - 13) 鈴木浩也、長尾朋和、板橋美津世、菅又龍一、山崎祐自、湯村和子、月田早智子、王碧昭、中山俊憲、鈴木和男 MPO-ANCA 関連血管炎における新しい自己抗体(抗 M 抗体)の関与と機能解析 第 16 回 MPO 研究会、2011年1月28-29日、仙台
 - 14) 亀岡洋祐、小浦美奈子、内田敬子、竹内喜久子、松田潤一郎、長尾朋和、宇野賀津子、大野尚仁、鈴木和男 ヒト monovalent-hScFv の評価検討 第 16 回 MPO 研究会、2011年1月28-29日、仙台
 - 15) Tomokazu Nagao, Koya Suzuki, Kentaro Utsunomiya, Mimiko Matsumura, Kan Saiga, Pi-Chao Wang, Haruyuki Minamitani, Yasuaki Aratani, Toshinori Nakayama, Kazuo Suzuki. Direct activation of glomerular endothelial cells by anti-moesin activity of antimyeloperoxidase antibody. 第 16 回 MPO 研究会、2011年1月28-29日、仙台
 - 16) 宇野賀津子、武曾恵理、猪原登志子、鈴木和男 ヒトのサイトカイン産生能と疾患特性、個人特性の検討 第 16 回 MPO 研究会、2011年1月28-29日、仙台
 - 17) 小野孝彦、呉 俊模、鈴木和男、野垣文昭

腎生検にて好中球浸潤性の毛細血管炎の像を認めたリウマチ性多発筋痛症の1例
第16回MPO研究会、2011年1月28-29日、仙台

- 18) 荒谷康昭、竹内一博、鈴木和男 ミエロペルオキシダーゼ欠損マウスのザイモザン誘発性肺炎の重篤化機構の解析 第16回MPO研究会、2011年1月28-29日、仙台

国際会議

- 1) Suzuki K, Kobayashi S, Fujimoto S, Hirahashi J. Discussion in DCVAS. EUVAS Meeting, June 13-17, Parma, Italy.
 - 2) Hidenori Yasuda, Nobuaki Yoshizawa, Masaaki Matsumoto, Shoji Kawachi, Kazuo Suzuki. Transmission of Pandemic H1N1 Influenza in Japan in 2009: Simulated Measures and Post-Analysis. Applied Mathematics International Conference 2010 (AMIC2010) & The 6th EASIAM Conference June 22-24, 2010, PNB Darby Park, Malaysia
 - 3) Reina Kusunoki, Tomokazu Nagao, Chiaki Iwamura, Shigeto Kobayashi, Wako Yumura, Toshinori Nakayama, Kazuo Suzuki. Treatments for MPO-ANCA-associated vasculitis in SCG/Kj mouse. August 23-27, 2010, 14th International Congress of Immunology, Kobe
 - 4) Tomokazu Nagao, Kohya Suzuki, Yasuaki Aratani, Pi-Chao Wang, Toshinori Nakayama, Kazuo Suzuki. Murine crescentic glomerulonephritis model using anti-MPO and anti-LAMP2 antibodies. August 23-27, 2010, 14th International Congress of Immunology, Kobe
 - 5) Kohya Suzuki, Tomokazu Nagao, Yasuaki Aratani, Pi-Chao Wang, Toshinori Nakayama, Kazuo Suzuki. Mechanism of neutrophil extracellular traps formation by anti-myeloperoxidase antibodies. August 23-27, 2010, 14th International Congress of Immunology, Kobe
 - 6) Ayako Mabuchi, Toshiyuki Ishiwata, Yuriko Tanaka, Terutaka Kakiuchi, Kazuo Suzuki, Antony M Wheatley. Role of F4/80+Mac-1high cells in Con A induced hepatitis. August 23-27, 2010, 14th International Congress of Immunology, Kobe
 - 7) R. Sugamata, K. Suzuki. Discussion in infectious diseases and vasculitis. VCRC meeting in Boston University Medical School, December 22, 2010, Boston, USA.
 - 8) R. Sugamata, K. Suzuki. Discussion in infectious diseases and vasculitis. VCRC meeting in Boston University Medical School, December 22, 2010, Boston, USA.
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
1. 特許取得
申請中：新規血管炎の検査方法および検査用試薬
 2. 実用新案登録 なし
 3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

ヒト制御性 T 細胞の分化誘導を促進させる生理活性物質の解析と
血管炎治療への応用

分担研究者 愛媛大学大学院医学系研究科生体統御内科学 長谷川 均

研究協力者 愛媛大学大学院医学系研究科生体統御内科学 松本卓也、金磊

研究要旨

【目的】血管炎などの自己免疫疾患の制御に制御性 T 細胞 (Treg) が重要な役割を演じている。末梢ナイーブ T 細胞から誘導されたヒト iTreg 細胞は、マウスと異なって、Foxp3 の発現が一過性で、抑制機能を持たないことが示されている。そこで Foxp3 の発現を増強させ、安定させる物質をスクリーニングし、抑制機能を持つヒト Treg 細胞への誘導が可能かどうかを検討した。その結果、PPAR α および γ アゴニストを得たので、これらのヒト Treg 細胞への抑制機能増強機序について解析した。【方法】PPAR α および γ アゴニストの投与による iTreg 細胞の Foxp3 発現、抑制機能、Foxp3 プロモーター領域やイントロン 1 内領域 (CNS3) のメチル化を検討した。さらに DNA methyltransferase の発現、trichostatin A(TSA)や all-*trans*-retinoic acid (ATRA) との相乗効果について検討した。【結果】PPAR α および γ アゴニストを投与した群では、iTreg 細胞の Foxp3 の発現増強がみられ、抑制機能を持つようになった。このことは PPAR アゴニストが DNA methyltransferase 発現を著しく低下させ、Foxp3 プロモーター領域および CNS3 領域の脱メチル化を促進させることによることが示唆された。さらに TSA や ATRA と併用すると相乗効果がみられた。【結語】これらの結果が血管炎の治療に寄与されることが期待される。

A. 研究目的

免疫系には免疫抑制機能に特化した制御性 T 細胞 (Treg) が存在し、自己免疫などの病的な免疫反応を抑制して免疫恒常性の維持に重要な役割を果たしている。転写因子 Foxp3 は Treg

の特異的マーカーであるが、Foxp3 の誘導メカニズムは十分解明されていない。ヒトナイーブ T 細胞から TGF- β で誘導される誘導性 Treg 細胞 (iTreg 細胞) の Foxp3 の発現は、低レベルでかつ一過的であり、この発現

細胞は抑制機能を持たない。そこで我々は、ヒト内在性 Treg 細胞 (nTreg 細胞) や iTreg 細胞の Foxp3 の発現を増強させ、安定させる物質を生理活性脂質や核内受容体リガンドからスクリーニングし、抑制機能を持つヒト Treg 細胞への誘導が可能かどうかを検討している。その結果、PPAR α と PPAR γ アゴニストを得たので、これらのヒト Treg 細胞への抑制機能増強機序について解析した。

B. 研究方法

健康人末梢血から CD4⁺T 細胞を分離し、核内受容体リガンドと生理活性脂質からのライブラリーからリガンドを添加して3日後、フロサイトメトリー法で Foxp3 の発現が増強するリガンドをスクリーニングした。15種類が単離でき、その中の PPAR α アゴニストとして Bezafibrate, ETYA, GW7647 の3種類、PPAR γ アゴニストとして Ciglitazone, 15-d-PGJ2 の2種類を用い、研究を進めた。nTreg 細胞として、末梢血の CD4⁺CD25⁺CD127^{low}T 細胞を用いた。一方、iTreg 細胞として、ナイーブ CD4⁺T 細胞 (CD4⁺CD25⁻CD45RA⁺T 細胞) を TGF- β 、抗 CD3/28 抗体、IL-2 と PPAR アゴニストで5日間培養後、IL-2 と PPAR アゴニストのみ7日間培養したものを用いた。これらの細胞の Foxp3 の発現、抑制機能と Foxp3 プロモーター領域、イントロン1内領域 (CNS3) のメチル化状態を、PPAR アゴニスト投与群とコントロール (DMSO 処理) 群とで

比較検討した。さらに DNA メチル化の維持に重要な DNA methyltransferase (DNMT) の発現について、比較検討した。また histone deacetylase inhibitor の trichostatin A (TSA) および all-trans-retinoic acid (ATRA) を添加し、PPAR アゴニストとの相乗効果について検討した。

(倫理面への配慮)

ヒト検体の採取にあたっては、愛媛大学倫理委員会の承認を受け、全例インフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

- 1) まず、nTreg 細胞に対する PPAR アゴニストの影響について検討した。その結果、5種類すべての PPAR アゴニストは、nTreg 細胞の Foxp3 の発現と抑制機能に影響を与えなかった。
- 2) iTreg 細胞に対する PPAR アゴニストの影響について検討した結果、PPAR α と γ アゴニストを投与した群では、コントロール群と比較して、5種類とも Foxp3 の発現増強がみられた (図1)。

図1 PPAR アゴニストで誘導した iTreg 細胞に Foxp3 が高発現で維持される分画がある

