

が、これ以上の処理時間によっても 500 ユニット程度にとどまる結果であった。エンドトキシン吸着剤 ET クリーンによる吸着除去では 1 回の吸着処理で 267 ユニットまで低下させることができた。アルカリ処理による加水分解とその後の ET クリーンによる吸着の組み合わせでは最終的にタンパク 1mg あたり 21 ユニットとかなりの程度に除去できたが、完全除去には至らなかった。

D. 考案

今年度は昨年度までに構築した人工ガンマグロブリン VH-CH1-h フラグメントの個々のクローンを再度精査し、塩基配列と、アミノ酸配列を確定し、さらに塩基配列の再解析から、昨年度に加えて 26 個の新たな有効クローンを加え、クローン総数を 204 クローンに増やすことができた。

ポリクローンのミックスバッチ培養より精製 hScFv を回収し、エンドトキシンの除去方法について検討を行った結果、アルカリグアニジン処理と ET クリーンによる吸着処理の組み合わせによって、タンパク 1mg あたり 21 エンドトキシンユニットまで混入量を低下させることができたが、検出限界以下まで低下させることができなかった。ここで精製された人工ガンマグロブリン VH-CH1-h フラグメントはアルカリ処理には抵抗性を示し、24 時間処理によってもウエスタンブロットによる解析では分解物は認められなかった。

ET クリーンによる吸着処理ではタンパクの吸着も避けられず、処理後のタンパク量の減少等の問題があるが、効率の良い除去方法なので、他の方法との組み合わせを

変えるなどの改良でさらにエンドトキシンの混入を下げることも考えられる。

本研究班の分担者、高橋、大野、宇野らによっても *in vitro* での生物活性測定が並行して進められており、エンドトキシンを検出限界以下まで除去した人工ガンマグロブリンを作出できる可能性を示した。このことにより人工ガンマグロブリンの製剤への可能性を示すことができた。

E. 結論

人工ガンマグロブリンを構成するクローンの塩基及びアミノ酸配列の精査によって最終的に 204 クローンの VH-CH1-h フラグメントを構成することができた。

組換えタンパク精製におけるエンドトキシン混入は製剤化における大きな問題である。今年度の検討で最終的に組換えタンパク 1mg あたり 21 エンドトキシンユニットまで下げることができたが、さらに除去処理を改良する必要がある。昨年度報告した ANCA 関連血管炎モデルマウス SCG/Kj での治療実験結果が示すように、ここで構築されたクローンライブラリーは有効なものであり、さらにエンドトキシンの完全除去ができれば人工ガンマグロブリンとして製剤を現実のものとするができる。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 東濃 篤徳, 坂手 龍一, 高橋 一朗, 足立 淳, 朝長 毅, 保富 康宏, 亀岡 洋祐、カニクイザル白血球における細胞外カルレティキュリンによる遺伝子発現の変化、第34回日本分子生物学会年会、2011年12月 横浜

2. 竹内 昌男, 東濃 篤徳, 竹内 喜久子, 牧野 初音, 田沼 玲子, 足立 淳, 高橋 一朗, 朝長 毅, 梅澤 明弘, 亀岡 洋祐、ヒト間葉系幹細胞株 (UE6E7T-3) の形質転換過程における mRNA 発現解析、第34回日本分子生物学会年会、2011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
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特記事項なし

C5 欠損マウスを用いた CAWS 血管炎誘発メカニズムの解析

研究分担者 大野 尚仁 東京薬科大学 教授

研究要旨： *Candida albicans* NBRC1385 の培養上清から得られる多糖画分である CAWS (*Candida albicans* water soluble fraction) を、マウスに腹腔内投与すると、大動脈起始部に血管炎 (CAWS 血管炎) を誘発する。CAWS 血管炎は、マウスの系統により感受性が異なり、DBA/2 では重症の血管炎が惹起され、経過に伴い死亡した。DBA/2 は補体成分 C5 の欠損を特徴とする。そこで、血管炎発症と補体の関係を明確にするため、数種の C5 欠損マウス (A/J, AKR/N) を用いて CAWS 血管炎感受性を比較検討した。これらのマウスに CAWS 4mg を 5 日間連続投与し、死亡時の心臓を摘出し切片を作成したところ、いずれも血管炎が生じていた。また、CAWS 4mg, 1mg, または 250 μ g 投与後長期間飼育すると死亡したが、生存日数は系統により異なっており、4mg x 5 回投与のとき、A/J では投与終了後 28 日目から死亡する個体が現れ始め 80 日目で全ての個体が死亡した。DBA/2 は 50 日目から、AKR は 60 日目から死亡する個体が現れ、140 日目の観察終了時においても AKR で 50% のマウスが生存していた。これらの結果から、C5 欠損は CAWS 血管炎を悪化させる因子の一つであるが、CAWS 血管炎の発症にはその他複数の因子が関与していることが考えられた。

A. 研究目的

CAWS は *Candida albicans* NBRC1385 を完全合成培地で培養すると、培養上清に産生される可溶性の多糖画分である。1970 年代より東邦大学医学部の直江らは、川崎病患児由来の *C.albicans* の菌体アルカリ抽出画分(CADS)をマウスに投与することにより、川崎病類似の冠状動脈炎を誘発できることを報告してきた。CAWS においても同様の血管炎誘発活性があることが確認されており、CAWS 血管炎を発症したマウスは川崎病態モデルとして有用であると考えられている。当研究室を中心としたこれまでの検討により、CAWS 血管炎の感受性はマウス系統間で差があること、中でも DBA/2

マウスは致死的な血管炎を発症することを明らかにしてきた。DBA/2 マウスの特徴として補体 C5 の欠損が挙げられる。したがって CAWS による DBA/2 の重篤な血管炎発症には、C5 の欠損が関わっている可能性が考えられる。そこで、その他の C5 欠損マウス (A/J, AKR) を用いて CAWS 血管炎の発症について DBA/2 と比較検討した。

B. 研究方法

CAWS 血管炎は、CAWS を腹腔内投与により 3 系統のマウス (A/J, AKR, DBA/2) に 5 日間連続投与して発症させた。投与終了日を day 0 として維持飼育し、生存率を比較した。day 42 にマウスを屠殺し、摘出した

各臓器より組織切片を作成した。また、これらのマウスから脾臓細胞を調整し、各種 PAMPs で *in vitro* 刺激した後、上清を回収し、MCP-1 の産生を ELISA で測定した。

C. 研究結果

1. C5 欠損マウスにおける CAWS 血管炎

CAWS を投与した A/J, AKR, DBA/2 の 3 系統のマウスを最終投与日から 42 日後に屠殺、大動脈起始部周辺の臓器切片を作成し HE, または EVG 染色した (Fig. 1)。その結果、3 系統のマウスは大動脈組織へ炎症性細胞浸潤や血管壁肥厚を伴う血管炎を発症した。また EVG 染色より、3 系統ともに大動脈弁周辺に線維化が生じていることが確認された。これらのことから A/J および AKR は DBA/2 と同様、CAWS 血管炎を発症することが明らかとなった。

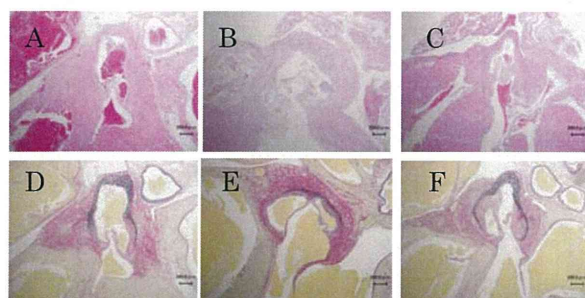


Fig. 1 Histological observation of coronary arteritis. CAWS (4 mg/mouse) was administered *i.p.* to A/J (A, D), AKR (B, E), and DBA/2 (C, F) mice for five consecutive days. After 4 weeks, mice were sacrificed and prepared section using Hmatoxylin-Esin (A-C) or with Elastica-van-Gieson (E-F) stain.

2. C5 欠損マウスの CAWS 血管炎による致死の検討

C5 欠損マウス(A/J, AKR)における CAWS 血管炎による致死を DBA/2 と比較した (Fig.

2)。DBA/2 マウスは、類似の実験を繰り返して検討しており、常にほぼ全例が死亡した。本実験においても、平均生存日数はこれまでの実験と類似しており、また、4mg または 1mg 投与群では観察終了時にも数個体が生存するのみであり、再現性は高かった。

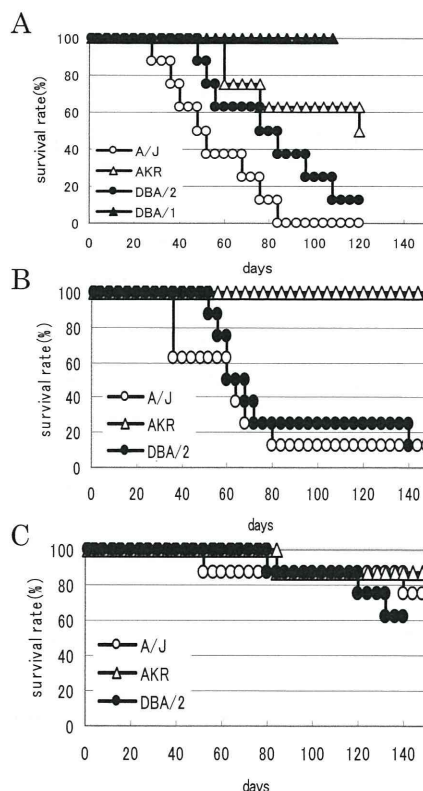


Fig. 2 Survival ratio of CAWS administrated A/J, AKR, DBA/2 mice

Each 4 mg (A), 1 mg (B), or 0.25mg (C) of CAWS was intraperitoneally administrated to mice for five consecutive days. The last day of five consecutive days is defined day 0, and survival ratio was observed.

このような実験背景のもと、投与量が 4mg x5 回するとき、A/J では投与終了後 28 日目から死亡する個体が現れ始め 80 日目で全ての個体が死亡した。AKR で 50% のマウスが生存していた。これらのことから A/J および AKR は DBA/2 と同様、CAWS 投与により致死的な血管炎を発症することが明

らかになった. このように C5 欠損マウス間でも生存日数に差が見られたことから, CAWS 投与による致死は多遺伝子により起こる現象であり, その一因子として C5 が関与している可能性が示唆された.

3. CAWS 刺激による MCP-1 産生の検討

炎症反応にはケモカインや接着分子が重要な役割を果たす. 中でもケモカインの一種である MCP-1 が川崎病の急性期に血中増加し, 組織においても発現が増強しているとの報告がある. そこで CAWS 血管炎における MCP-1 の産生について検討した. その結果, C5 欠損マウスは C5 を有するマウスと比較して CAWS 刺激による MCP-1 の産生が高い傾向にあった. MCP-1 産生の亢進は単球をより強く炎症部位へ遊走させ血管炎発症において増悪因子となっていると考えられた.

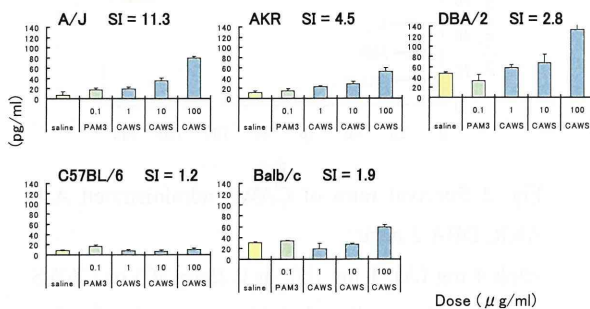


Fig. 3 MCP-1 production in culture supernatants of splenocytes from A/J, AKR, DBA/2, C57BL/6, Balb/c mice stimulated with PAM₃-CSK₄ or CAWS.

Prepared splenocytes were cultured with PAM₃-CSK₄ (0.1 μg/ml) or CAWS (1, 10 100 μg/ml) for 48 hours at an initial density of 5x10⁶ cells/ml. The culture supernatants were collected and measured for MCP-1 levels using ELISA.

D. 考案

C5 欠損マウスではアナフィラトキシン C5a が産生されない. C5a は強力な炎症メディエータであり, 白血球の遊走活性も示す. したがって, 血管炎は減弱傾向を示すと予測されたが, いずれの C5 欠損マウスでも血管炎は増悪傾向を示したことから, 本モデルにおいて C5 は増悪因子であることが更に強く示唆された.

文献検索してみると, C5a の働きの一つとして, 肝臓を切除した後の再生に C5a は重要な働きをするという報告がある. CAWS 血管炎の場合も, 急性期に損傷した血管壁の修復が C5a 欠損ではうまく行かない, という可能性も考えられた. また, A/J マウスはカンジダ感染すると C5a を持つマウスに比べ炎症性サイトカインの産生が上昇するという報告もあり, C5a を欠損するマウスはその代償機構が働いていた. 今回の CAWS 血管炎誘発にも C5a 欠損マウスではその代償機構が強く働き結果として血管炎が重症化している可能性も考えられた. これらの可能性について, 今後さらに検討を加えたい.

E. 結論

本研究により, DBA/2 に加え, A/J および AKR も CAWS 投与により CAWS 血管炎を発症して死亡することが明らかとなった. マウスが死亡するまでの生存日数には系統差が見られたことから, CAWS による致死は複数の遺伝子が関与していることが示唆された. 更に C5 欠損マウスは C5 を有するマウスよりも, CAWS 刺激による MCP-1 の産生能が亢進していることが明らかになった.

これらのことから CAWS 血管炎の発症は、多遺伝子が関与して起こる現象であること、また、その発症に関わる因子の一部として C5 の欠損や MCP-1 の産生亢進が関与していることが示唆された。

CAWS 血管炎は、冠状動脈起始部に頻発する血管炎であり、川崎病急性期に発症する血管炎と類似している。CAWS 血管炎の病態や、その発症メカニズムを詳細に解析することは、CAWS 血管炎の川崎病病態モデルとしての有用性を高めるのみならず、川崎病の発症メカニズムや治療を考える上でも大変重要であると考えている。さらなる研究を継続したい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. R. Tada, Y. Takano, H. Murakami, K. Ishibashi, N. Nagi-Miura, Y. Adachi, **N. Ohno**. Vasculitis and anaphylactoid shock in mice induced by the polysaccharide fraction secreted into culture supernatants by the fungus *Candida metapsilosis*. *Microbiol Immunol*, 55, 357–365(2011).
2. K. Takahashi, T. Oharaseki, T. Nagao, Y. Yokouchi, H. Yamada, N. Nagi-Miura, **N. Ohno**, T. Saji, T. Okazaki and K. Suzuki. Mizoribine provides effective treatment of sequential histological change of arteritis and reduction of inflammatory cytokines and chemokines in an animal model of Kawasaki disease. *Pediatric Rheumatology*, online J. 9(1), 30(2011).

2. 学会発表

国際会議

1. T. Oharaseki, Y. Yokouchi, K. Sadamoto, N.

Ohno, T. Saji, K. Suzuki, K. Takahashi. Anti-TNF- α therapy for murine systemic vasculitis induced by *Candida albicans* water-soluble fraction: an animal model of KD. 15th International Vasculitis & ANCA Workshop 2011/5/15 North Carolina, USA

2. N. Nagi-Miura, H. Murakami, H. Hanawa, Y. Aizawa, Y. Adachi, K. Suzuki, N. Ohno. Involvement of GM-CSF in acute lethal shock induced by *Candida albicans* water-soluble fraction (CAWS) in mice. IUMS (International Union of Microbiological Societies) 2011 2011/9/6 Sapporo, Tokyo
3. N. Nagi-Miura, Y. Takano, Y. Adachi, K. Ishibashi, H. Hanawa, Y. Aizawa, K. Suzuki, N. Ohno. Interleukin-10 inhibit CAWS-vasculitis induced by extracellular mannoprotein- β -glucan complex of *Candida albicans*. The 10th International Kawasaki Disease Symposium 2012/2/7 Kyoto, Japan
4. N. Nagi-Miura, Y. Takano, R. Okuda, Y. Arai, Y. Ishimoto, S. Iiyama, H. Uchida, Y. Adachi, K. Ishibashi, H. Hanawa, Y. Aizawa, K. Suzuki, N. Ohno The effect of Interleukin-10 to CAWS-vasculitis induced by extracellular mannoprotein- β -glucan complex of *Candida albicans*. Asia Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop 2012 2012/3/28 Tokyo, Japan

国内会議

1. 大村 崇, 三浦典子, 石橋健一, 安達禎之, 大野尚仁 *Candida albicans* 由来の菌体外多糖画分 CAWS 投与によるマウス血管炎モデルの早期炎症応答における系統差 第 23 回 微生物シンポジウム 2011 年 9 月 2 日 千葉
2. 奥田遼, 三浦典子, 大野尚仁 CAWS 応答性における IL-6 の関与の解析 第 55 回 日本薬学会関東支部大会 2011 年 10 月 8 日 東京
3. 三浦典子, 石橋健一, 安達禎之, 大野尚仁 補体 C5 欠損マウスを用いた CAWS 血管炎の検討 第 55 回日本医真菌学会学術集会 2011 年 10 月 21-22 日 東京

4. 三浦典子, 伊坂春香, 石橋健一, 安達禎之, 大野尚仁 補体 C5 欠損マウスを用いた CAWS 血管炎発症の比較 第 17 回 MPO 研究会 2011 年 10 月 28-29 日 熊本

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

MPO-ANCA 関連血管炎患者の IFN システム不全と易感染性

分担研究者 宇野賀津子

財)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 財)田附興風会北野病院医学研究所・腎臓内科

猪原登志子 京都大学・探索医療センター)

研究要旨： MPO-ANCA 血管炎患者は易感染性であり、大量IVIg療法が有効であることが明らかにされている。その易感染性の一因として、私達はこれ迄に MPO-ANCA 血管炎患者のインターフェロン(IFN)システムの不全を明らかにしてきた。即ち、IFN- α 産生能 (HVJ 刺激) の低下、末梢血中のプラズマサイトイド樹状細胞数の極端な減少、健常人では感染時を除いて認められない血漿中の IFN- α や β の存在である。このような IFN システム不全の原因として、先行する感染が関連しているのではないかと考え、MPO-ANCA 血管炎患者の血漿中の LAMP-2、Calprotectin、BPI を測定した。LAMP-2 および Calprotectin は、ANCA 血管炎患者では健常人に比較して有意に高値であった。また一部の患者について、ANCA 血管炎患者の治療後、数ヶ月から数年後の寛解期に IFN システムを測定したが、多くの場合、あまり改善は認められなかった。

A. 研究目的

MPO-ANCA 血管炎の IFN システム不全の原因をさぐるため、先行する感染との関係、IFN システムの長期予後を検討した。

サイトイド樹状細胞 (pDC) は CD3⁺, CD19⁻, CD14⁻, HLA-DR⁺, BDCA-2⁺細胞を FACS にて同定し、pDC とした。また血清中の IFN- α および β を ELISA およびビーズアレイ法にて測定した。

B. 研究方法

北野病院に入院した MPO-ANCA 腎炎患者 (Male:n=22, Female:n=22) を対象とした。また PR3-ANCA 患者 (Male:n=22, Female:n=22)、60 才以上の健常人 (Male:n=22, Female:n=19) についても同様に測定し、比較した。

LAMP-2 (lysosomal-associated protein -2)、Calprotectin (Neutrophil Extracellular Traps 中の抗真菌因子)、BPI (bacterial/permeability increasing protein) は ELISA にて測定した。

IFN- α 産生能の測定は、全血にセンダイウイルスを入れ、20 時間後に上清を回収し、IFN 活性をバイオアッセイ法にて測定し、産生能とした。また全血中のプラズマサイ

これらの研究は、財)田附興風会北野病院医学研究所および財)ルイ・パストゥール医学研究センター倫理委員会からの承認を得て、採血は患者および健常人ボランティアから informed consent を得て行った。

C. 研究結果

C-1 急性期の MPO-ANCA 腎炎患者の IFN- α 産生能

急性期の MPO-ANCA 腎炎患者の IFN- α 産生能は、健常人に比較して大きく低下していた。健常人の平均は 10401 \pm 917 IU/ml、MPO-ANCA 腎炎患者の平均は 4784 \pm 896 IU/ml、PR3-ANCA 腎炎患者では 7591 \pm 2938 IU/ml で、健常人に比較して MPO-ANCA 腎炎患者では有意に低下していた。また、健常人では 4000 IU/ml 以下を示す人は 5.4% であったが、MPO-ANCA 腎炎患者では 60.4% であり、これら患者の IFN 産生能は高頻度で低値を示した。

図 1 MPO-ANCA 腎炎患者の IFN- α 産生能

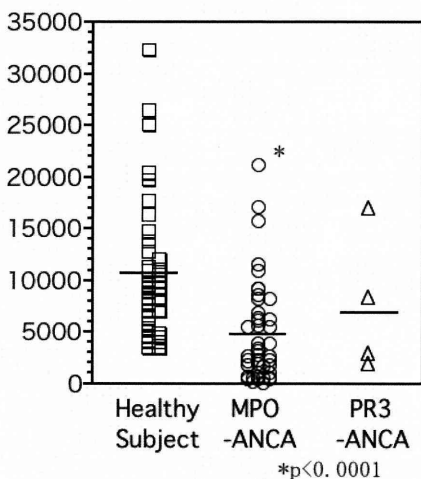
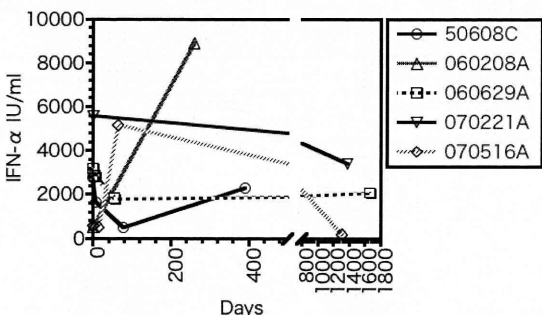


図 2 に MPO-ANCA 腎炎患者の IFN- α 産生能の長期経過を示した。回復した症例も認められたが、多くの症例では数年後も低い状態が続いていた。

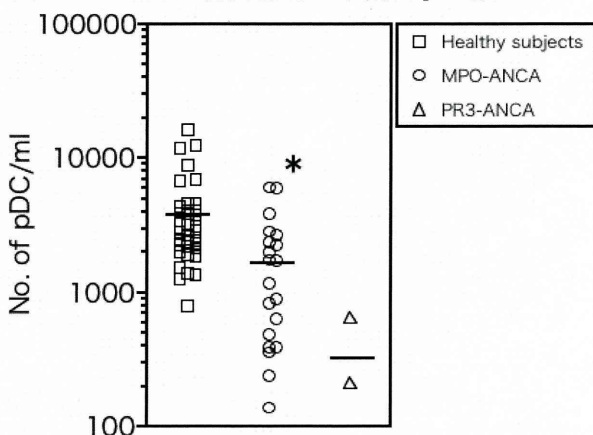
図 2 IFN- α 産生能の長期経過



C-2 MPO-ANCA 腎炎患者のプラズマサイトイド樹状細胞数

IFN- α 産生能低下の原因を探るために、主いた。結果を図 1 に示す。主たる IFN- α 産生細胞である、pDC 数について検討した。MPO-ANCA 腎炎患者のうち、約半数の患者 pDC 数は、図 3 に示すように健常人に比べて大きく低下していた。症例は少ないが PR3-ANCA 腎炎患者の pDC 数も大きく減少していた。

図 3 MPO-ANCA 腎炎患者の末梢血 pDC 数



C-3 血中 IFN

血中 IFN- α と IFN- β について測定した。特に IFN- α 産生能の低値群において、血中 IFN- β が検出された。

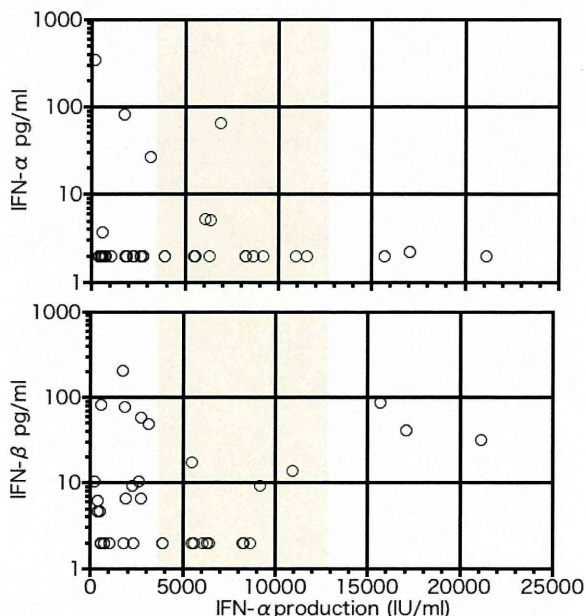
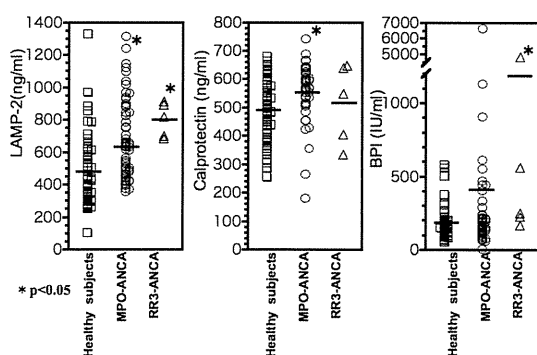


図4 MPO-ANCA 腎炎患者の血中 IFN
健常人ではほとんど血漿中には、IFN- α / β は検出されなかったことから、MPO-ANCA 腎炎患者では、IFN システムの制御不全が推察された。

C-3 血中 LAMP-2、Calprotectin、BPI

MPO-ANCA 腎炎患者の多くににおいて、血中に IFN が検出されたこと、また pDC 数の極端な減少の一因として、先行する感染との関連が推察された。そこで、LAMP-2 (lysosomal-associated protein -2)、Calprotectin (Neutrophil Extracellular Traps 中の抗真菌因子)、BPI (bacterial/permeability increasing protein) を ELISA 法で検討した。その結果、MPO-ANCA 腎炎患者で LAMP-2、Calprotectin が有意に高値であった。また一部患者では BPI が高値を示した。このことは、多くの MPO-ANCA 腎炎患者において、先行して感染が認められた可能性が示唆された。

図5 MPO-ANCA 腎炎患者 LAMP-2、Calprotectin、BPI



D. 考案

MPO-ANCA 腎炎患者の病態、特にその易感染性の原因を探るために、患者の IFN システムを健常人と比較した。その結果 IFN- α 産生能および、IFN の主たる産生細胞であ

る pDC 数が過半数の患者で大きく低下していた。またその低下は、寛解後も長期にわたり続く場合が多かった。このことは、MPO-ANCA 腎炎患者の易感染性の一因に IFN システム不全との関連性が考えられた。また、IFN- α 産生能の低値群に特に血中に IFN- α / β が認められたことは、MPO-ANCA 腎炎患者では、IFN システムの調節不全の可能性も示唆された。

この IFN システム不全の原因を探るために、感染に関連した因子である LAMP-2、Calprotectin、BPI を測定した。その結果 MPO-ANCA 腎炎患者では LAMP-2、Calprotectin、が有意に高値であり、腎炎発症に先行して、感染があった可能性が示唆された。

E. 結論

MPO-ANCA 腎炎患者では IFN システムの低下および調節不全が認められた。このことは、患者の易感染性の一因である可能性が示唆された。また MPO-ANCA 腎炎発症に先行して、感染関連因子が血中に認められる可能性が明らかにされた。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Uno K, Okuno K, Hamuro J

Intracellular glutathione in monocytes are useful biomarker of immune status of tumor bearing patients The European Journal of Clinical & Medical Oncology, (2012) in press

2. Asahina A, Uno K, Fujita H Sequential occurrence of pemphigus vulgaris and palmoplantar pustulosis: Possible role of cytokine profile. *Acta Derm Venereol.* (2012) 92: 89-90
3. Y. Yasuda, T. Shimoda, K. Uno, N. Tateishi, S. Furuya, Y. Tsuchihashi, Y. Kawai, S. Naruse, S. Fujita Temporal and sequential changes of glial cells and cytokine expression during neuronal degeneration after transient global ischemia in rats (2011) *Journal of Neuroinflammation* 8,70
4. ISHIKAWA T, KOKURA S, SAKAMOTO N, MATSUMOTO T, FUNAKI J, ADACHI S, OKAYAMA T, UCHIYAMA K, HANDA O, TAKAGI T, YAGI N, ANDO T, UNO K, NAITO Y and YOSHIKAWA Y Adoptive cellular therapy enhances the helper T cell response and reduces the number of regulatory T cells (2011) *EXPERIMENTAL AND THERAPEUTIC MEDICINE* 2: 737-743,
5. Kamide Y, Utsugi M, Dobashi K, Ono A, Ishizuka T, Hisada T, Koga Y, Uno K, Hamuro J, Mori M Intracellular glutathione redox status in human dendritic cells regulates IL-27 production and T cell polarization (2011) *Allergy.* Sep;66(9):1183-92
6. Onomoto K, Morimoto S, Kawaguchi T, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Uno K, Kumada T, Matsuda F, Shimotohno K, Fujita T, Murakami Y Dysregulation of IFN System Can Lead to Poor Response to Pegylated Interferon and Ribavirin Therapy in Chronic Hepatitis C. (2011) *PLoS ONE* May Volume 6,
7. 宇野賀津子、八木克巳、谷川真理、吉川敏一、藤田哲也 健常人における *IFN- α* 産生能と加齢の影響 *Pasken □J* (2011) vol. 21/22, 1-4
8. 村田圭一郎、宇野賀津子 インターフェロン- γ 産生能測定のための ELISA 法、BioPlex 法によるインターフェロン- γ 量測定の比較検討 *Pasken □J* (2011) vol. 21/22, 10-12
9. 宇野賀津子 あなたと隣の HIV ウォームアップクイズ: 「ほんとうに知っている? HIV のこと」と 「やってみようどこでも使える実践ワーク」によるエイズ予防教育の試み *Pasken □J* (2011) vol. 21/22, 42-48
10. 宇野賀津子 「今、再び」インフルエンザにインターフェロン: The preventive effect of human interferon-alpha on influenza infection; Modification of clinical manifestations of influenza in children in a closed community. 1982 の再検討 *Pasken □J* (2011) vol. 21/22, 5-9
11. 宇野賀津子 私たちの身体を守るインターフェロンシステム *Schneller* 2011, No.77 新年冬号, 12-17
12. 宇野賀津子 免疫とアンチエイジング *アンチエイジング 総合臨床* 2011 Vol.60, No.3 343-350
2. 学会発表
国際会議
1. Eri Muso, Kazuko Uno, Toshiko Ihara, Kazuo Suzuki Effect of IVIg monotherapy on “cytokine and chemokine storm” in acute phase of

MPO-ANCA positive microscopic polyangiitis(MPA) 15th International Vasculitis & ANCA Workshop. May 15-18, 2011, in Chapel Hill, North Carolina

2. K Uno Yagi K, Tanigawa M, Yoshikawa T, Fujita S Aging effects on human type I IFN system: generalized linear mixed model analysis of longitudinal study for 24 years 第76回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、第19回マクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウム (大阪) 2011.5.25-27

3. K Uno, Eri Muso, Toshiko Ihara, Kazuo Suzuki Impairment of IFN- α production, peripheral plasmacytoid dendritic cell number and susceptibility to MPO-ANCA-associated vasculitis 9th Joint Conference of the International Cytokine Society and the International Society for Interferon and Cytokine Research (フィレンツェ) 2011.10. 9-11

国内会議

1. 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〔仙台〕 2011.1.28-29
2. 宇野賀津子、八木克巳、谷川真理、吉川敏一、藤田哲也 ヒトインターフェロンシステムと加齢- 24年間のデータベースの混合モデルによる縦断的解析-第11回日本抗加齢医学会総会 (京都)、2011.5.27-28
3. 宇野賀津子、武曾恵理、猪原登志子、鈴木和男 MPO-ANCA 関連血管炎患者の IFN システム不全と感染抵抗性 第17回 MPO 研究会 (熊本) 2011.10.28-29

4. Uno K, Tanigawa M Aging effects on human type I IFN system: linear mixed model analysis of 24 year longitudinal study 第40回日本免疫学会学術集会 (千葉) 2011.11.27-29

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

自己免疫疾患患者の血液細胞に見られる変動遺伝子群の包括的理解

研究協力者 野島 博 大阪大学・微生物病研究所 教授

研究要旨：川崎病などの自己免疫疾患に対する有効な治療法の一つに高用量ヒト免疫グロブリン静注療法 (IVIG) がある。本研究は、未解明な IVIG 治療メカニズムの理解を目指し、作用機序を突き止め、治療効果を予測する手段を探ることを目的とする。自己免疫疾患の中で特に難治性血管炎患者の血液細胞内では特異的に転写誘導あるいは抑制されている遺伝子群が存在する予想される。これらについてマイクロアレイ解析法を用いて包括的に単離し、選抜アレイ (focused microarray) を作製するなど低侵襲な血 RNA 診断法の開発も行なってきた。一連のプロジェクトを進める中で収集及び解析中の血管炎症候群 (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)、川崎病などの患者血液細胞 (白血球) において共通に抽出された転写誘導 (抑制) される遺伝子群についてパスウェイ解析やネットワーク解析を行った結果、病態に依存した遺伝子の発現変化が補体システムに関連する遺伝子群に現れることが判明したので報告する。

A. 研究目的

自己免疫疾患患者の末梢血液より血液細胞を採取し、これら病態に共通あるいは特異的に遺伝子発現が亢進・抑制される遺伝子群を包括的に抽出する。そして疾患発症 (治療経過) に深く関連する遺伝子を見出し解析することで、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群の転写プロファイルを個々の患者で調べて病態との関連付けを行うことも目的とする。

B. 研究方法

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)、ウエグナー肉芽腫症

(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)、バージャー病 (BD)、結節性多発動脈炎 (PN)、川崎病を対象に各検体より採取した RNA を用いて DNA チップ解析 (Agilent, Hu44K) 解析を行った。本研究課題期間内は各病態で抽出される変動遺伝子群を用い、ネットワーク解析とパスウェイ解析を中心に行った。病態間で共通して認められる特定のパスウェイ内での変化や特有に認められる変化について解析を行った。

(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

これまでに複数の難治性血管炎を対象にして病因を遺伝子発現レベルで解明すべく、患者末梢血液細胞を用いてトランスクリプトーム解析を進めた。この3カ年は疾患および疾病に特化したインジェヌイティ社製のネットワークシステムを用いて再解析を行った。その結果、すべての血管炎において補体系因子の mRNA レベルが異常に増加していることが新たに判明した (図1)。補体系は 20 以上のタンパク質とタンパク質断片からなるが、血管炎の病態依存的に mRNA 量が増加している補体系因子が異なるという興味深い事実も明らかとなった。たとえば Churg-Strauss 症候群では FCN1, MCP, C2a, C5AR が亢進し、MPA では FCN1, MCP, C5A が、高安病では FCN1, MCP のみが亢進した。高安病については患部を抗 FCN1 抗体で免疫染色し強いシグナルが得られることを確認した。一方、川崎病のモデルである CAWS によって DBA/2 系マウスに惹起された血管炎では FCN1 とともに大半の補体系副経路因子の mRNA レベルが異常に増加していた。それとは逆に下流の C7 の mRNA レベルが異常に減少しているという特徴も示した。血管炎とは離れるが、他の自己免疫疾患の例としてベーチェット

病を解析したところ大半の患者で下流の C5、C7、C9 の mRNA レベルは増加していたが C6、C8 は減少していた。また IgA 腎症では C7 の mRNA レベルが増加していた。

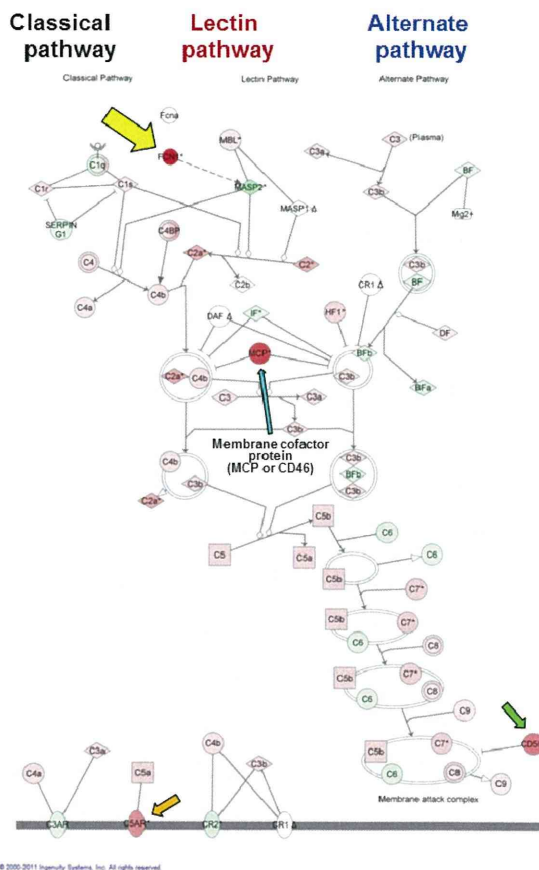


図1 ; Churg-Strauss 症候群の補体システムのパスウェイ図。各遺伝子が健常人より発現更新している場合は赤、抑制される場合は緑色で示される。特に黄矢印の FCN1 は強い赤で、その他の矢印で示す MCP, C2a, C5AR もピンク色で示される。

D. 考案

何故、難治性血管炎で補体系制御が異常になっているかの解明が今後の課題である。独自に開発したリューコキャッチを用いて採取した白血球の総タンパク質をもウエスタン法などにより解析しながら研究を進め

てゆきたい。

E. 結論

ここで得られたパスウェイ解析結果は今後の難治性血管炎の確定診断用ツール、例えばパスウェイ内に存在するタンパク質群のをマーカーとして想定するなど実用化できる可能性がある結論できる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Tabara H, Naito Y, Ito A, Katsuma A, Sakurai MA, Ohno S, Shimizu H, Yabuta N, Nojima H. Neonatal lethality in knockout mice expressing the kinase-dead form of the gefitinib target GAK is caused by pulmonary dysfunction. *PLoS One*. 2011;6(10):e26034.
- 2 Zhang K, Rodriguez-Aznar E, Yabuta N, Owen RJ, Mingot JM, Nojima H, Nieto MA, Longmore GD. Lats2 kinase potentiates Snail1 activity by promoting nuclear retention upon phosphorylation. *EMBO J*. 2011. doi: 10.1038/emboj.2011.357.
- 3 Iwatani H, Iio K, Nagasawa Y, Yamamoto R, Horii A, Okuzaki D, Inohara H, Nojima H, Imai E, Rakugi H, Isaka Y. Microarray analysis of tonsils of IgA nephropathy patients. *Adv Otorhinolaryngol*. 2011;72:75-8.
- 4 Okuzaki D, Kimura S, Yabuta N, Ohmine T, Nojima H. LeukoCatch, a quick and efficient tool for the preparation of leukocyte extracts from blood. *BMC Clin Pathol*. 2011 Aug 17;11:9.

- 5 Yabuta N, Mukai S, Okada N, Aylon Y, Nojima H. The tumor suppressor Lats2 is pivotal in Aurora A and Aurora B signaling during mitosis. *Cell Cycle*. 2011 Aug 15;10(16):2724-36.
- 6 Nojima H, Tougan T. Preparation of a high-quality cDNA library from a single-cell quantity of mRNA using chum-RNA. *Methods Mol Biol*. 2011;729:15-35.
- 7 Okada N, Yabuta N, Suzuki H, Aylon Y, Oren M, Nojima H. A novel Chk1/2-Lats2-14-3-3 signaling pathway regulates P-body formation in response to UV damage. *J Cell Sci*. 2011 Jan 1;124(Pt 1):57-67.
- 8 Tougan T, Kasama T, Ohtaka A, Okuzaki D, Saito TT, Russell P, Nojima H. The Mek1 phosphorylation cascade plays a role in meiotic recombination of *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Cycle*. 2010 Dec 1;9(23):4688-702.
- 9 Okuzaki D, Fukushima T, Tougan T, Ishii T, Kobayashi S, Yoshizaki K, Akita T, Nojima H. Genopal™: a novel hollow fibre array for focused microarray analysis. *DNA Res*. 2010 Dec;17(6):369-79.
- 10 Aylon Y, Ofir-Rosenfeld Y, Yabuta N, Lapi E, Nojima H, Lu X, Oren M. The Lats2 tumor suppressor augments p53-mediated apoptosis by promoting the nuclear proapoptotic function of ASPP1. *Genes Dev*. 2010 Nov 1;24(21):2420-9.
- 11 Funato Y, Terabayashi T, Sakamoto R, Okuzaki D, Ichise H, Nojima H, Yoshida N, Miki H. Nucleoredoxin sustains Wnt/ β -catenin signaling by retaining a pool of inactive dishevelled protein. *Curr Biol*. 2010 Nov 9;20(21):1945-52.
- 12 Okuzaki D, Kasama T, Hirata A, Ohtaka A, Kakegawa R, Nojima H. Spo5 phosphorylation

- is essential for its own timely degradation and for successful meiosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Cycle*. 2010 Sep 15;9(18):3751-60.
- 13 Shigehisa A, Nojima H, Kasama T, Tohda H, Hirata A, Nojima H. Mug28, a meiosis-specific protein of *Schizosaccharomyces pombe*, regulates spore wall formation. *Mol Biol Cell*. 2010 Jun 15;21(12):1955-67
- 14 Iio K, Nagasawa Y, Iwatani H, Yamamoto R, Horii A, Nojima H, 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 Mar 19;393(4):565-70.
- 14 Aylon Y, Yabuta N, Besserglick H, Buganim Y, Rotter V, Nojima H, Oren M. Silencing of the Lats2 tumor suppressor overrides a p53-dependent oncogenic stress checkpoint and enables mutant H-Ras-driven cell transformation. *Oncogene*. 2009 Dec 17;28(50):4469-79.
- 15 Sato J, Shimizu H, Kasama T, Yabuta N, Nojima H. GAK, a regulator of clathrin-mediated membrane trafficking, localizes not only in the cytoplasm but also in the nucleus. *Genes Cells*. 2009 May;14(5):627-41.
- 16 Nishioka N, Inoue K, Adachi K, Kiyonari H, Ota M, Ralston A, Yabuta N, Hirahara S, Stephenson RO, Ogonuki N, Makita R, Kurihara H, Morin-Kensicki EM, Nojima H, Rossant J, Nakao K, Niwa H, 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. 学会発表
国際会議
1. H. Nojima Disturbance of the complement system is linked to the pathogenesis of vasculitis. AP-VAS-2012, 2012/3/28-30 Tokyo, Japan.
- 国内会議
1. 野島 博 イブニングレクチャー「細胞生物学者の視点でみるマイクロアレイと次世代シーケンス」第62回日本細胞生物学会大会、2010年5月19日、大阪
2. 野島 博 最新ゲノム研究と臨床への応用 第1回臨床ゲノム医療学会学術大会 2011年12月11日 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
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
技術移転など
(1)平成20年8月29日移転・提携先企業名：(株)ジーンデザイン；チャムRNA（Chum-RNA）
(2)平成21年12月18日、移転・提携先企業名：深江化成；リユーコキャッチ（LeukoCatch）

川崎病類似マウス血管炎モデルを用いた ヒト monovalent-hScFv の病理組織学的評価

研究分担者 高橋 啓 東邦大学医療センター大橋病院病理診断科 教授
(研究協力者 大原関利章、横内幸、山田仁美(東邦大大橋病理)、佐地勉(東邦大
小児)、三浦典子、大野尚仁(東薬大)、亀岡洋祐(医薬基盤研)、長尾朋和、富澤一
夫、鈴木和男(千葉大))

研究要旨：CAWS 誘発マウス血管炎モデルに monovalent-hScFv(hScFv)を投与した場合、免疫グロブリンよりも低用量で系統的血管炎抑制効果を示す可能性があることが示された。今後、容量、投与方法などについて慎重に検討を加える必要がある。

A. 研究目的

CAWS 誘発マウス血管炎モデルに対して同研究班において作製された hScFv を投与した際の血管炎抑制作用を検討する。

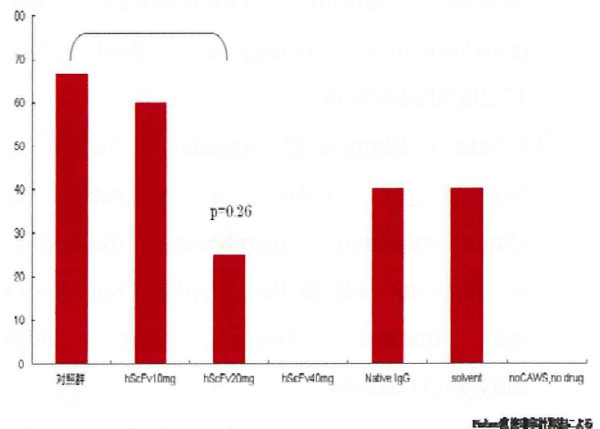
B. 研究方法

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、hScFv を 9, 4.5, 2.25 mg/kg を連続 5 日間腹腔内投与した。また、ヒト免疫グロブリン(hIg)400mg/kg を同様に投与する群を設けた。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、炎症の程度を病理組織学的に検討した。

C. 研究結果

hScFv4.5mg/kg 投与群では未治療群と比較して汎血管炎の発生頻度、炎症範囲、炎症程度は抑制傾向を示した。2.25mg/kg 投与

群では抑制傾向は得られなかった。一方、9mg/kg 投与群では屠殺前に死亡例が生じた(表)。



D. 考案

鈴木らは SCG/kj マウスへの投与実験において 178 クローンのセットからなるポリクローナル VH-CH1-hinge は脾臓腫脹抑制、末梢血白血球、リンパ球の減少、MPO-ANCA 抗体産生抑制、サイトカインの産生

抑制を示すことなどを報告している。今回は同一クローンセットからなる hScFv を CAWS 誘発血管炎モデルに投与し、血管炎発生に及ぼす影響を予備的に検討した。その結果、hScFv は hIG よりも低用量で血管炎抑制作用を示す可能性が示された。その一方で、高用量群では致死例が存在した。今後、これらの点について詳細に検討する必要がある。

E. 結論

予備的検討であり、さらなる検討が必要であるが、hScFv は血管炎抑制作用を有する可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Rowley AH, Baker SC, Shulman ST, Rand KH, Tretiakova MS, Perlman EJ, Garcia FL, Tajuddin NF, Fox LM, Huang JH, Ralphe JC, Takahashi K, Flatow J, Lin S, Kalelkar MB, Soriano B, Orenstein JM.: Ultrastructural, immunofluorescence, and RNA evidence support the hypothesis of a "new" virus associated with Kawasaki disease. *J Infect Dis.*; 203(7):1021-30. 2011
2. Breunis WB, Davila S, Shimizu C, Oharaseki T, Takahashi K, van Houdt M, Khor CC, Wright VJ, Levin M, Burns JC, Burgner D, Hibberd ML, Kuijpers TW; On behalf of the International Kawasaki Disease Genetics Consortium.: Disruption

of vascular homeostasis in Kawasaki Disease patients: Involvement of vascular endothelial growth factor and angiopoietins. *Arthritis Rheum.* Sep 8. [Epub ahead of print]. 2011

3. Takahashi K, Oharaseki T, Tomokazu N, Yokouchi Y, Yamada H, Miura NN, Ohno N, Saji T, Okazaki T, Suzuki K: Mizoribine provides effective treatment of sequential histological change of arteritis and reduction of inflammatory cytokines and chemokines in an animal model of Kawasaki disease. *Pediatric Rheumatology* 9(30) Epub. 2011
 4. Takahashi K, Oharaseki T, Yokouchi Y, Pathogenesis of Kawasaki disease. *Clinical & Experimental Immunology* 164: 20-22 2011
 5. 大原関利章, 横内幸, 直江史郎, 高橋啓: 川崎病動脈炎と疾患モデルの病理学的特徴. *小児科診療* 74:1221-1227 2011
- ##### 2. 学会発表
- ##### 国際会議
1. Oharaseki T, Yokouchi Y, Sadamoto K, Ohno N, Saji T, Suzuki K, Takahashi K: Anti TNF- α therapy for murine systemic vasculitis induced by *Candida albicans* water soluble fraction : an animal model of Kawasaki disease. 15th International Vasculitis & ANCA Workshop. Chapel Hill, USA, 2011.5
 2. Takahashi K, Oharaseki T, Yokouchi Y: Pathogenesis of Kawasaki disease. 15th International Vasculitis & ANCA Workshop.

Chapel Hill, USA, 2011.5

3. Takahashi K: Cardiovascular pathology at the acute and remote stages in Kawasaki disease. the 7th congress of Asian society for pediatric research. Denver, USA, 2011.5

国内会議

1. 原田真菜, 横内幸, 大原関利章, 直江史郎, 高橋啓, 清水俊明: 川崎病剖検例における心筋炎の病理組織学的検討. 第31回日本川崎病学会, 2011/09, 横浜
2. 高橋啓, 大原関利章, 横内幸, 山田仁美, 直江史郎, 亀岡洋祐, 大野尚仁, 鈴木和男: 川崎病類似マウス血管炎モデルを用いたヒト monovalent-hScFv1 の病理組織学的評価. 第17回 MPO 研究会, 2011/10, 熊本
3. 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の血管炎成立過程におよぼす抗 TNF- α 療法の影響. 第52回日本脈管学会総会, 2011/10, 岐阜

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

臓器炎におけるサイトカイン、ケモカインの産生と作用に関する検討 —細胞外基質の変化と DAMPS としてのヘム蛋白—

研究分担者 埜 晴雄 新潟大学大学院医歯学総合研究科 講師

研究要旨：血管炎や臓器炎においてはサイトカインやケモカインが重要な役割を演じているが、その産生や作用は多岐にわたる。そのためそれらの機序を広く理解することが治療上も重要である。細胞外基質は細胞の固定だけでなく、サイトカインの誘導や作用と密接に関係している。また、DAMPS と考えられ全身に広く存在するヘムが細胞外に放出されると、在住マクロファージ/樹状細胞は炎症促進サイトカインやケモカインを強力に誘導する。本年度は臓器炎におけるこれらについて検討を加えた。細胞外基質であり、サイトカイン産生にも影響のあるオステオポンチンは他の細胞外基質と異なり、心筋炎の発症直前から急激に上昇し、急性期には著しく増加した。また細胞外基質を分解する多くの MMP の発現は心筋炎発症初期から増加し、MMP-3、MMP-9 は IL-1 によって誘導され、その阻害作用を有する TIMP-1 は発症、IL-1 刺激によって増加する一方、TIMP-3 は発症や IL-1 刺激によりむしろ低下した。細胞外基質の分解を阻害する SLPI は、ラット心筋炎を有意に改善させた。在住マクロファージ/樹状細胞は、フリーのヘムだけでなく、ミオグロビン、ヘモグロビンなどのヘム蛋白自体によっても炎症促進蛋白の発現が強く誘導され、これらは TLR4 を介した反応であると考えられた。これらの機序は血管炎、臓器炎の進展過程に少なからず関わっていると考えられた。

A. 研究目的

血管炎や臓器炎においては様々な機序がその進展過程に関わっている。特にサイトカインやケモカインは重要であり、治療上もそれらの関わる事象を理解することが重要である。細胞外基質は細胞間を埋めて細胞を固定するだけでなく、サイトカインやケモカインの産生や作用と密接に関わっている。また、それらの重要な産生細胞である在住マクロファージ/樹状細胞は、様々な内因性リガンドに反応することが近年明らかになり、我々はフリーのヘムが重要な

DAMPS となってサイトカインやケモカインを誘導することを報告した。本年度は、上記の点についてさらなる検討を加えた。

B. 研究方法

ラット自己免疫性心筋炎モデルを作成し、その心臓から経時的に RNA を抽出し、サイトカイン、細胞外基質、MMP、TIMP の遺伝子発現を調べた。また、心臓から採取した培養細胞に IL-1 を添加し、それらの発現誘導を調べた。さらに細胞外基質の分解を阻害する SLPI によるラット心筋炎の治療