

IVIG 治療における川崎病末梢血の遺伝子プロファイリング

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：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であるかについて理解するため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免疫疾患特有の転写誘導（抑制）を示すことを発見した。本年度は川崎病患者 9 検体について IVIG 治療前と治療 3 日後について抹消単核球由来の RNA をマイクロアレイ解析し、IVIG 治療への診断・予想マーカーになりうる遺伝子群の抽出を行った。

A. 研究目的

IVIG 治療前と治療後 3 日目について患者の末梢血液細胞内 mRNA を用いて DNA マイクロアレイ解析を行う。IVIG 治療に対する応答性と相関して発現が亢進・抑制された遺伝子群を抽出し、IVIG 治療効果予測に深く関わる遺伝子群を解析し、IVIG 投与の応答性を治療開始前に判定可能なシステム構築を目的とする。

B. 研究方法

佐地グループ（東邦大学）と共同研究を行い、川崎病の発症が疑われる患者より少量の末梢血液を IVIG 治療前後に採取、保管した。末梢血液より RNA 抽出後、マイクロアレイ解析を行った。今回は 10 検体（RNA 調整の段階で 9 検体）について解析を進め、共通して各検体で治療前後に発現が亢進・抑制される遺伝子群、及び IVIG 治療への応答性に依存して変動する遺伝子群の抽出を行った。

（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

9 検体のうち、IVIG 治療に応答した 3 検体と非応答の 6 検体間で抽出された遺伝子群は現在のところ 100～200 遺伝子を抽出することができた。これらの群の中には炎症反応に関わるものなど抹消血液中の免疫反応を示す遺伝子も含まれていた。図 1 は 9 検体間の IVIG 治療の応答性に依存する遺伝子群をまとめたクラスタリング結果の一例である。

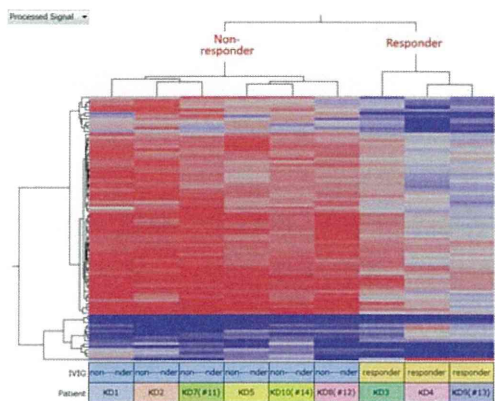


図1 ;IVIG 治療に対して応答性を示した3検体(オレンジ)と不応答を示した6検体(青)の2群間でIVIG 治療前後での遺伝子発現変動に違いが認められる約90 遺伝子をクラスタリングした結果。クラスタリング内の各遺伝子発現が亢進(赤)、抑制(青)、変化なし(灰)で示され、系統樹から右側の応答群と左側の不応答群に分けられていることがわかる。

D. 考案

現在まで想定する 20 検体のうち約半分の数値化解析まで進めることできた。残り約 10 検体を順次解析を進め、これまでに抽出した IVIG 応答性遺伝子群から疑陽性を除き、予測システムの制度を高めると共に、リアルタイム PCR で再確認などを進める。

E. 結論

解析前に IVIG 治療応答遺伝子群のうち IVIG 治療応答に依存して変動する遺伝子群がどれくらいの数でどの程度の変動か未知数であったが、佐地グループの協力の元で IVIG 治療応答に相関して2倍前後変動する遺伝子群が効果的に抽出できている感触を得ることができた。今回までに得られている IVIG 治療応答性遺伝子群の生物学的な解釈も鑑みながら予測診断システムの構築を進める。

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.

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
なし
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 人工ガンマグロブリン製剤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、鈴木和男(千葉大))

研究要旨：人工ガンマグロブリン製剤化へ向け治療評価系としての CAWS 誘発マウス血管炎モデルの妥当性について検討した。本血管炎誘発モデルにヒト免疫グロブリン(hIG)、抗 TNF- α 製剤を投与すると血管炎は有意に抑制され、本血管炎モデルは治療評価系としても利用可能であることが示された。次いで、本研究班にて作製された monovalent-hScFv (hScFv) を投与した予備的検討において、hScFv は hIG よりも低用量で血管炎を抑制できる可能性が示唆された。今後、さらなる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 hIG、TNF- α 製剤、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ことを目的とした。

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、hIG、抗 TNF- α 製剤、hScFv をそれぞれ連続 5 日間投与した。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。

C. 研究結果

hIG 投与群では未治療群(対照)と比較し

て汎血管炎の発生頻度は有意に低下し、さらに炎症範囲、炎症の強さも有意に軽減化された。

抗 TNF- α 製剤、特にエタネルセプトを投与した場合、血管炎発生頻度、炎症範囲、程度はいずれも顕著に軽減化された。

一方、hScFv 中用量投与群では対照と比較して汎血管炎の発生頻度、炎症範囲、炎症程度が抑制される傾向にあった。しかし、低用量群では抑制効果は得られず、高用量群では経過中に死亡する個体が発生した。

D. 考案

CAWS 誘発マウス血管炎モデルでは冠状動脈、大動脈起始部や腎動脈などに高頻度に血管炎が惹起され、その組織像は単球/マクロファージを主とする増殖性炎症であるなど、川崎病と類似する点が多い。

本実験系に hIG を投与すると汎血管炎の発生は有意に抑制されたが、多くの個体で内膜あるいは内膜・外膜に炎症細胞浸潤が生じており、hIG は炎症の発生そのものを制御するのではなく、汎血管炎への進展を抑制する可能性がある。

本マウス血管炎誘発モデルでは CAWS 投与後早期に血漿 TNF- α が上昇することがこれまでに明らかになっている。また、本実験では抗 TNF- α 製剤投与群においていくつかの血漿炎症性サイトカインの上昇が抑制されていた。抗 TNF- α 製剤が TNF- α の作用を阻害することで汎血管炎に至る一連の炎症過程を抑制しているものと考えられた。

最後に、CAWS 鈴木らは SCG/kj マウスへの投与実験において、今回実験に用いた 178 クロウ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。予備的検討ながら本モデルにおいても hScFv が血管炎抑制的に作用していることが示された。

E. 結論

CAWS 誘発マウス血管炎モデルは人工ガンマグロブリン製剤化に向けての評価系として有用であり、今後さらなる検討を行う予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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, Ohareseki 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
6. Kobayashi S, Fujimoto S, Takahashi K, Suzuki K: Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis, Large Vessel Vasculitis and Kawasaki Disease in Japan. *Kidney& Blood Pressure Research*. 33:442-55. 2010
 7. 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* 20: 160-7, 2010
 8. Takahashi K, Oharaseki T, Yokouchi Y, Hiruta N, Naoe S: Kawasaki Disease as a Systemic Vasculitis in Childhood. *Ann Vasc Dis* 3: 173-81, 2010
 9. 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
 10. 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
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
 4. 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
 5. 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
 6. 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

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
4. 横内 幸, 大原関利章, 伊原文恵, 直江史郎, 高橋 啓: 川崎病急性期におけるリンパ節の病理組織学的検討 第99回日本病理学会総会, 2010/04, 東京
5. 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, 2010/04, 東京
6. 高橋 啓, 大原関利章, 横内 幸: 膠原病と消化管病変の病理 第6回 膠原病臨床病理研究会, 2010/05, 東京
7. 高橋 啓, 大原関利章, 横内 幸, 山田仁美, 直江史郎: 血管炎後遺症としての冠状動脈瘤形成成人剖検例の臨床病理学的検討 第15回血管病理研究会, 2010/10, 東京
8. 大原関利章, 横内 幸, 儘田 洋, 井原文恵, 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: 川崎病類似マウス系統的動脈炎モデルにおける抗 TNF-a 製剤の動脈炎抑制効果の組織学的検討 第51回日本脈管学会総会, 2010/10, 旭川
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の血管炎成立過程におよぼす抗 TNF-a 療法の影響, 第30回 日本川崎病学会, 2010/10, 京都
10. 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-a 療法の血管炎抑制効果, 第30回日本川崎病学会, 2010/10, 京都
11. 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 Mizoribine の有効性 第16回MPO研究会, 2011/01, 仙台
12. 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

13. 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
14. 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
15. 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
16. 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

臓器炎における炎症促進蛋白の産生とその阻害による治療の検討

分担研究者 相澤義房 所属 新潟大学大学院医歯学総合研究科 役職 教授

研究協力者 塙 晴雄 所属 新潟大学大学院医歯学総合研究科 役職 講師

研究協力者 小玉 誠 所属 新潟大学大学院医歯学総合研究科 役職 准教授

研究要旨：人工グロブリンによる血管炎や臓器炎に対する治療の有効性を検討する上で、その炎症の機序を明らかにすることは重要である。この中でも炎症性サイトカインやケモカインなどの炎症促進蛋白が病態形成に重要な役割を演じることは周知の事実である。近年、病原体などの外因性の物質ではなく組織傷害によって放出される内因性の物質が、これら炎症促進蛋白の産生を誘導し、炎症をさらに進展することがわかってきた。我々は、その中でも全身に広く存在するヘムおよびヘム蛋白に注目し、それによる炎症進展機序を検討した。さらに我々は治療についても検討を加えた。炎症性サイトカインの中でも IL-1 は強力なサイトカインである。我々は、IL-1 を阻害する IL-1 受容体-Ig ヘテロダイマーの効果について、現在用いられている IL-1 阻害薬と比較検討した。それらの結果、ヘモグロビン、ミオグロビン、ヘムは IL-1、TNF- α 、IL-6 などの炎症促進蛋白を強力に誘導する DAMPS(ダメージ関連分子パターン)であると考えられ、また IL-1 受容体-Ig ヘテロダイマーは、従来用いられている阻害薬よりも強力な IL-1 阻害作用を持つことが明らかになった。

A. 研究目的

人工グロブリンの治療対象となる血管炎や臓器炎は、サイトカインやケモカインなどの炎症促進蛋白が重要な役割を演じ、病態が形成されていく。従って、これらの動態を把握することは重要である。近年、病原体などの外因性の物質である PAMPS(病原体関連分子パターン)だけでなく、組織や細胞が傷害を受けたときに生じる DAMPS(ダメージ関連分子パターン)によって、これら炎症促進蛋白が誘導されることがわかってきた。我々は、心筋炎の DNA マイクロアレイを用いた検討から、鉄関連蛋白特にヘム蛋白が臓器炎などに大きな影響を与える

のではないかと推測し、これらが DAMPS となるかどうか、またその炎症促進蛋白が誘導される機序は何かについて検討した。また我々は、治療についても検討を加えた。IL-1 は重要な炎症誘導サイトカインであるが、これを阻害する作用を有する生物学的製剤として、IL-1 受容体-Ig ヘテロダイマーの阻害効果を現在使われている IL-1 阻害薬と比較し、新たな生物学的製剤になりうるかどうかを検討した。

B. 研究方法

1. ヘムによる炎症促進蛋白誘導の検討
 - a) 心臓在住培養細胞の作成

ラットの両心室を生理食塩水で十分洗って細かく刻んだ後、コラゲナーゼ処理し、茶こしを用いてすりつぶして細胞を分離し、RPMI1640 溶液中で 2-3 週間培養した。CD11bc 陰性心臓在住培養細胞は、さらに MACS マグネット細胞ソーティングシステムを用いて、CD11bc 陽性細胞を除去して精製した後に、同様に 2-3 週間培養した。

b)ヘム刺激

心臓在住培養細胞、各種初代培養細胞および細胞株に、20 μ M のヘミンを加え、経時的に細胞を採集した。また ROS 産生の阻害作用をもつスーパーオキシドスカベンジャーである tiron を hemin 付加の 3 時間前から培養液に加え、プロテアーゼ阻害薬は、hemin 付加の 1 時間前から 25 μ M TPCK あるいは 300 μ M TLCK を培養液に加えた。細胞内の ROS の測定は、心臓在住培養細胞と CM-H2DCFDA 色素液を用いて、hemin (20 μ M) を添加後 60 分間インキュベートし、フローサイトメトリーにて解析した。

c)細胞染色

心臓在住培養細胞の特徴を同定するため、上記のように分離した細胞を Lab-Tek II chamber slides で 2 週間同様に培養し、マウス抗 α -smooth muscle actin 抗体、ウサギ抗 factor VIII-related Ag 抗体、ウサギ抗 rat collagen type III 抗体あるいはマウス抗ラット CD11bc 抗体 (OX-42) とビオチン化抗ウサギ・マウス抗体 anti-rabbit and anti-mouse Igs を用いて染色した。

d)炎症促進蛋白の発現

上述した検体から総 RNA を抽出し、cDNA を合成し、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、MCP-1、MIP-1 α 、MIP-2、CINC-1、CINC-2、CCL5、G-CSF、GM-CSF、Cox-2、PGES、iNOS、HO-1、

Lipocalin-2/NGAL についてライトサイクラーにて測定した。また培養上清を採集し、その上清中の IL-1 β と TNF- α の値を Rat IL-1 β ELISA Kit および Rat TNF- α ELISA Kit を用いて測定した。

e)TLR の関与

TLR4KO マウス腹腔マクロファージのヘムによる IL-1 の誘導、マクロファージ細胞株のミオグロビン、ヘモグロビンによる IL-1 の誘導を検索した。さらに TLR2、3、4(MD2+CD14)、5、7、8、9、NOD1、2 をそれぞれ遺伝子導入した HEK293 細胞、TLR2、TLR4、TLR6 を共発現した HEK293 細胞を用いてヘムによる IL-8 の誘導あるいは NF- κ B 活性をしらべ、ヘムの炎症促進蛋白誘導経路を検討した。

2, IL-1 受容体-Ig ヘテロダイマーの IL-1 抑制作用の検討

ヒトおよびラットの IL-1 受容体-Ig ヘテロダイマーリコンビナント蛋白を pCAGGS plasmid をもちいて Cos7 細胞に遺伝子導入して作成し、同様に作成した他の IL-1 阻害薬である IL-1 受容体アンタゴニスト (IL-1RA)、IL-1 受容体 Acp-IL1 受容体 type I-Ig homodimers (IL-1R inline trap) と比較検討した。IL-1 阻害作用は、NRK-49F および MRC-5 培養細胞に IL-1 とその阻害薬をそれぞれ同時に添加し、その MCP-1 と IL-8 の遺伝子発現を定量的 RT-PCR にて測定し、検討した。

C. 研究結果

1, ヘムおよびヘム蛋白による炎症促進蛋白誘導

心臓在住培養細胞はヘミン刺激によって、

IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、MCP-1、MIP-1 α 、MIP-2、CINC-1、CINC-2、CCL5、G-CSF、GM-CSF、Cox-2、PGES、iNOS および HO-1、Lipocalin-2/NGAL の急激で著明な遺伝子発現の上昇がみられ、培養上清中に IL-1 β 、TNF- α 蛋白の産生上昇もみられた。しかし、CD11bc 陰性の心臓在住培養細胞あるいは初代培養細胞のヘミン刺激では、その上昇はほぼ消失していた。一方ラットマクロファージの細胞株 NR8383 のヘミン刺激では、IL-1 β 、TNF- α の顕著で著明な発現上昇がみられ、CD11bc 陰性の心臓在住培養細胞に直接 IL-1 α 、TNF- α で刺激をしたところ、様々な炎症促進蛋白の顕著な上昇が認められた。これらは、主にマクロファージがヘムに反応していることが示唆される結果であり、それが IL-1 α 、TNF- α などを産生し、さらに線維芽細胞などの細胞が反応し、様々な炎症促進蛋白を誘導するものと考えられた。また、ヘミン刺激 1 時間後、心臓在住培養細胞内の ROS の産生は明らかに増加し、Tiron によって ROS 産生はほぼ完全に抑えられた。しかし、Tiron を加え、ヘミンで刺激しても、様々な炎症促進蛋白の顕著な上昇の抑制はみられなかった。一方、TPCK、TLCK を加えると、様々な炎症促進蛋白の顕著な遺伝子発現上昇がほぼ完全に抑制された。これらは、炎症促進蛋白の上昇は ROS の産生によって起こるのではなく、NF- κ B を介していることを強く示唆していた。さらに、TLR4KO マウスの腹腔マクロファージはヘムによる IL-1 誘導がほとんどみられず、ヘムの刺激は TLR4 を介すると考えられた。また、ヘムだけでなく、ヘモグロビン、ミオグロビン自体でもマクロファージ細胞株は強力に IL-1 発現が誘導され

た。しかし、様々な TLR を単独で遺伝子導入した HEK 細胞を用いた炎症促進蛋白誘導経路の検討では、どの HEK 細胞でも IL-8 は強い誘導は示さず、その反応経路はスカベンジャー受容体など、他の分子も関わっている可能性が想定された。

2, IL-1 受容体-Ig ヘテロダイマーの IL-1 抑制作用

ヒトおよびラットの IL-1 受容体-Ig ヘテロダイマーリコンビナント蛋白は IL-1RA や IL-1R inline trap など現在使われている IL-1 阻害薬剤に比し、強力に IL-1 α 、IL-1 β を阻害した。

D. 考案

ヘミンと炎症との関わりについては、血管透過性亢進、接着因子の発現、IL-8 の発現の増強、MCP-1 の発現増強などいくつか報告がみられる。今回の我々の検討で得られた新たな知見は、一つには、正常心臓の在住細胞の培養細胞でも、ヘミンによる遺伝子発現が誘導されることが明らかになったことである。さらに、IL-1 β 、IL-6、MCP-1、MIP-1 α 、MIP-2、CINC-1、CINC-2、CCL5、G-CSF、GM-CSF、Cox-2、PGES などのたくさんの炎症促進因子、iNOS や Lipocalin-2/NGAL の発現が、ヘミンによって強く誘導されたことも新たな知見である。また、この時に反応する細胞は、主に心臓在住マクロファージと考えられたことも新たな知見である。また心臓在住培養細胞に対する、ヘミンによる遺伝子発現誘導の機序であるが、今回の我々の検討では、Tiron によって細胞内 ROS を抑制しても、遺伝子発現の変化はみられなかった。一方、

TPCK、TLCK などのプロテアーゼ阻害薬によって、多くの遺伝子発現が明らかに抑制された。これらのプロテアーゼ阻害薬による発現誘導抑制効果は、NF- κ B/NF- κ B を介していることを強く示唆している。また TLR4 は重要な DAMPS 受容体であるが、ヘムもこれを介した反応であると考えられる結果であった。しかし、TLR4+MD2+CD14 を遺伝子導入した HEK 細胞でもヘムに反応しなかったことは、LPS とは異なる経路を示していると考えられる。その他の TLR を単独で遺伝子導入した HEK 細胞、TLR2, 4, 6 を同時に遺伝子導入した HEK 細胞でも反応せず、その詳細な機序はまだ不明であり、今後の検討が必要である。おそらくスカベンジャー受容体など他の分子もこの反応経路に関わっている可能性が推測される。

炎症におけるサイトカインの重要性は言うまでもないが、IL-1 はその中でも中心的な役割を演じているものの一つである。今回、IL-1 受容体-Ig ヘテロダイマーリコンビナント蛋白は、既に実用化されている IL-1 阻害薬に比し、非常に強力な阻害作用を有していた。これを実用化することによってヒトの炎症疾患に対する治療薬となりうる可能性が示唆された。

E. 結論

血管炎、臓器炎において、ヘム蛋白やフリーのヘムは在住マクロファージに作用し、様々な炎症促進蛋白を誘導し、その進展機序に大きな影響を与えられた。また血管炎、臓器炎で重要な役割を演じると考えられる IL-1 を阻害できる IL-1 受容体-Ig ヘテロダイマーリコンビナント蛋白は、今後新たな生物学的製剤となりうる可能性

があると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Isoda M, Hanawa H, Watanabe R, Yoshida T, Toba K, Yoshida K, Kojima M, Otaki K, Hao K, Ding L, Tanaka K, Takayama T, Kato K, Okura O, Kodama M, Ota Y, Hayashi J, Aizawa Y. Expression of the peptide hormone hepcidin increases in cardiomyocytes under myocarditis and myocardial infarction. *J Nutr Biochem* 21: 749-756, 2010.
- 2) Ding L, Hanawa H, Ota Y, Hasegawa G, Hao K, Asami F, Watanabe R, Yoshida T, Toba K, Yoshida K, Ogura M, Kodama M, Aizawa Y. Lipocalin-2/neutrophil gelatinase-B associated lipocalin is strongly induced in hearts of rats with autoimmune myocarditis and in human myocarditis. *Circ J.* 74: 523-530, 2010.
- 3) Hanawa H, Ota Y, Ding L, Chang H, Yoshida K, Otaki K, Hao K, Kasahara S, Kodama M, Nakazawa M and Aizawa Y: IL-1 Receptor Accessory Protein-Ig/IL-1 Receptor Type II-Ig Heterodimer Inhibits IL-1 Response More Strongly than Other IL-1 Blocking Biopharmaceutical Agents. *J Clin Immunol* 31: 455-464, 2011.
- 4) Hao K, Hanawa H, Ding L, Ota Y, Yoshida K, Toba K, Ogura M, Ito H, Kodama M and Aizawa Y: Free heme is a danger signal inducing expression of proinflammatory

proteins in cultured cells derived from normal rat hearts. Mol Immunol 48: 1191-1202, 2011.

2. 学会発表

国際会議

1. H. Hanawa T. Yoshida, R. Watanabe, K. Hao, L. Ding, M. Kodama, Y. Aizawa. Autoimmune myocarditis and its mechanism ISHR 2010 2010/5/13-16 Kyoto Japam
2. H. Hanawa, K. Hao, T. Yoshida, R. Watanabe, M. Kodama, Y. Aizawa Free heme and heme proteins as endogenous ligands strongly induce proinflammatory proteins via toll-like receptor-4 in cardiovascular diseases. 28th ISHR 2011/12/2-3 TOKYO

国内会議

1. L. Ding, H. Hanawa, K. Hao, K. Otaki, T. Yoshida, R. Watanabe, M. Kodama, Y. Aizawa Lipocalin-2 a New Biomarker of Inflammatory Heart Disease? 第73回日本循環器学会総会 平成 21 年 3 月 20-22 日 大阪
2. 羽尾和久、埴 晴雄、丁 立民、鳥羽 健、渡辺律雄、吉田 剛、小玉 誠、相澤義房 Free Heme strongly induces pro-inflammatory proteins in cultured cells derived from normal rat hearts 第74回日本循環器学会総会 2010 年 3 月 5-7 日 京都
3. 埴 晴雄、羽尾和久、吉田香織、小玉 誠、相澤義房 心筋炎により心臓内鉄関連蛋白の遺伝子発現は著明に亢進する 第 34 回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会

2010 年 9 月 11-12 日 東京

4. 埴 晴雄、羽尾和久、小玉 誠、相澤義房 Cytokine induced gene expression in cardiomyocytes can be identified by quantitative RT-PCR analysis in multiple sample from myocarditis hearts 第 14 回日本心不全学会学術集会 2010 年 10 月 7-9 日 東京
5. 埴 晴雄、羽尾和久、柏村 健、小幡裕明、伊藤正洋、小玉 誠、長谷川 剛、相澤義房 フリーのヘムは Toll 様受容体を介して心臓在住マクロファージを強力に活性化する 第 15 回日本心不全学会学術集会 2011 年 10 月 13-15 日 鹿児島

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

菌体成分誘発性肺炎における食細胞機能異常の影響

分担研究者： 荒谷康昭

横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科・教授

研究要旨：

炎症誘発における食細胞由来活性酸素の影響を個体レベルで知るために、ミエロペルオキシダーゼ(MPO)あるいは食細胞 NADPH オキシダーゼ(gp91^{phox})の各ノックアウトマウス(MPO-KO マウス、CGD マウス)における、ザイモザンとカンジダ死菌による肺炎の病態を解析した。MPO-KO マウスにザイモザンあるいはカンジダ死菌を経鼻投与すると、そのいずれにおいても野生型マウスよりも重篤な肺炎を発症した。また、CGD マウスにカンジダ死菌を投与しても MPO-KO マウスと同様に重篤な肺炎を発症した。興味深いことに、MPO-KO マウスからの単離好中球に培養下でザイモザンの刺激を加えると、野生型好中球よりも高いMIP-2 産生能を示した。すなわち、MPO の欠損による好中球からの MIP-2 産生の促進が、MPO-KO マウスにおけるザイモザン誘発性肺炎の重篤化の一因になっている可能性が示された。

A. 研究目的

炎症誘発における食細胞由来の活性酸素の関わりを知ることを目的とした。MPO は主に好中球に存在し、過酸化水素と塩化物イオンから次亜塩素酸を生成する反応を触媒する。一方、食細胞 NADPH-オキシダーゼは好中球と単球に存在し、病原体感染時に活性化して、酸素からスーパーオキシドを産生する反応を触媒する。この酵素複体のうちの gp91^{phox} を欠くノックアウトマウス(CGD マウス)や MPO-KO マウスにカンジダ菌を肺感染させると、野生型マウスよりも重篤な肺炎を誘発して早期に死亡することを以前に報告している。感染した菌を

殺菌できないことがその理由であると考えられる。本研究では、同じカンジダ菌株の死菌あるいは酵母菌体抽出物であるザイモザンを用いて肺炎を誘発させ、菌体成分誘発性炎症における食細胞由来活性酸素の影響を探った。

B. 研究方法

野生型マウス (C57BL/6 マウス) は日本 SLC から購入した。MPO-KO マウスは、C57BL/6 マウスに 10 回以上戻し交配して、C57BL/6 と遺伝的背景を等しくした後に使用した。いずれも 8-10 週令の雄マウスを使用した。マウスの飼育は、公立大学法人

横浜市立大学動物実験指針、横浜市立大学木原生物学研究所動物実験指針に準じて飼育管理した。

市販ザイモザンの懸濁液をマウスに経鼻投与した。一方、カンジダ死菌は、本研究班員である東京薬科大学 大野尚仁教授および三浦典子講師より分与を受けた。この菌体を LPS フリーの PBS に懸濁し、各マウスに麻酔下で経鼻的に肺に投与した。菌体投与後の肺の組織切片を HE 染色して、肺の炎症像を組織学的に解析するとともに、肺胞洗浄によって回収された細胞数を計測した。さらに、回収した細胞の細胞種をフローサイトメトリーで同定した。抗 MIP-2 抗体を投与する際は、ザイモザン投与 30 分前に経鼻的に投与した。

(倫理面への配慮)

動物実験にあたっては、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」等を遵守し、公立大学法人横浜市立大学動物実験指針、同八景キャンパス動物実験指針、ならびに同木原生物学研究所動物実験指針に準じた。必要最小限のマウスを使用することに努め、やむを得ず安楽死させる際には頸椎脱臼法を採用した。ノックアウトマウスは、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に準じて、組換え体として飼育した。

C. 研究結果

野生型マウスにザイモザンを経鼻投与すると、投与後 6 日目まではほぼ同程度の軽度の肺炎しか観察されなかった。一方、MPO-KO マウスの炎症は、投与後 1 日目ですでに野生型マウスよりも進行し、6 日目には重篤な炎症が発症した (図 1A)。

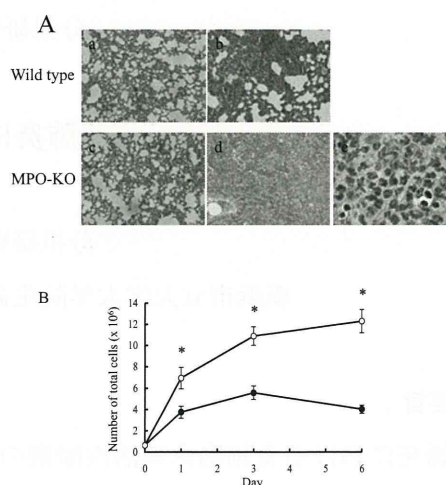


図 1 ザイモザン投与後の肺炎像(A)と肺胞洗浄によって回収された細胞数

(A) a,c:ザイモザン非投与、b,d,e:投与 6 日

(B) ●野生型マウス、○MPO-KO マウス

投与後 6 日目の MPO-KO マウス肺からは野生型マウス肺の 5 倍量の細胞が回収された (図 1B)。その 8 割以上が好中球であった。以上より、MPO-KO マウスの方が野生型マウスより、ザイモザンで誘発される好中球性肺炎が早期に重篤になることが明らかとなった。MIP-2 は好中球の炎症患部への遊走を促進する。ザイモザン投与後 6 時間の肺組織中の MIP-2 量は、MPO-KO マウスの方が野生型マウスよりも 3 倍高値を示した (図 2)。MIP-2 が真に MPO-KO マウスにおける好中球の浸潤に関わっているかを知るために、MIP-2 抗体を経鼻投与して中和した結果、好中球の集積が半減したことから MIP-2 は炎症初期の好中球の集積に関与していることが明らかになった。

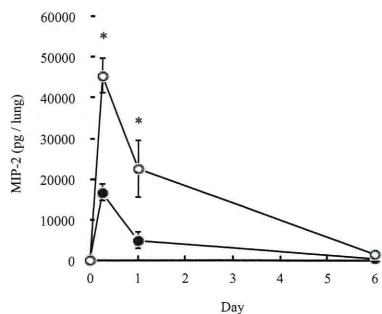


図2 肺ホモジネート中の MIP-2 量
● 野生型マウス ○MPO-KO マウス

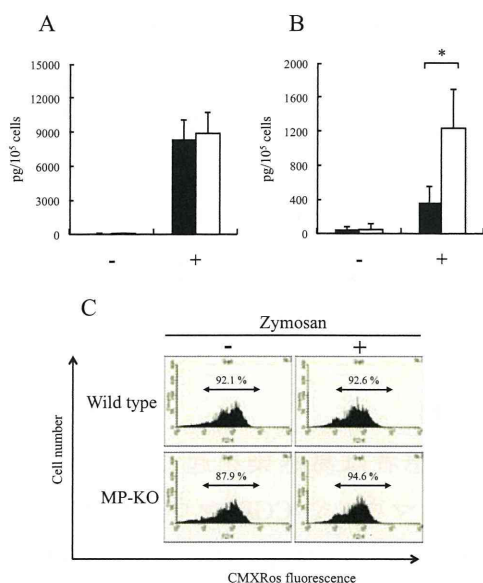


図3 肺泡マクロファージ(A)および単離好中球(B)からの MIP-2 産生量と CMXRos による細胞呼吸量の測定(C) ■野生型 □MPO-KO

MIP-2 の産生源を明らかにするために、ザイモザン投与後 6 時間後に肺泡洗浄によって肺泡に集積した細胞を回収し MIP-2 の細胞内染色を行った。その結果、肺泡マクロファージと好中球が MIP-2 を産生してい

ることが判明した。さらに、野生型および MPO-KO マウスの大腿骨髄から単離した好中球に培養下でザイモザンを添加して 6 時間培養し、培地に分泌された MIP-2 量は、MPO-KO マウス好中球が野生型よりもおよそ 3 倍高値を示した (図 3B)。一方、単離した肺泡マクロファージにザイモザンを添加して 6 時間培養しても MIP-2 の産生が認められたが、野生型と MPO-KO との間に産生量の違いはなかった(図 3A)。培養前後の細胞のミトコンドリア呼吸量に相違は認められなかったことから(図 3C)、MIP-2 産生量の違いが細胞死によるのではないことが確認できた。さらに、MPO の組換え標品を培養液中に添加すると部分的ではあるが有意に MIP-2 の産生が抑制された (図 4)。

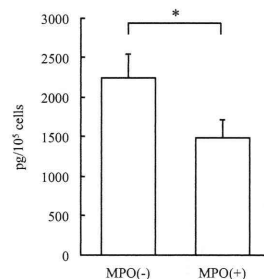


図4 MPO-KO 好中球からの MIP-2 産生における組換え MPO 添加の効果

次に、野生型、MPO-KO マウス、および CGD マウスにカンジダ死菌を経鼻投与し、6 日目の肺組織切片 H&E 染色像を鏡したところ、野生型マウスは、ごく軽度の肺炎が生じていなかったのに対して、MPO-KO マウスと CGD マウスでは重度の炎症像が観察された (図 5)。

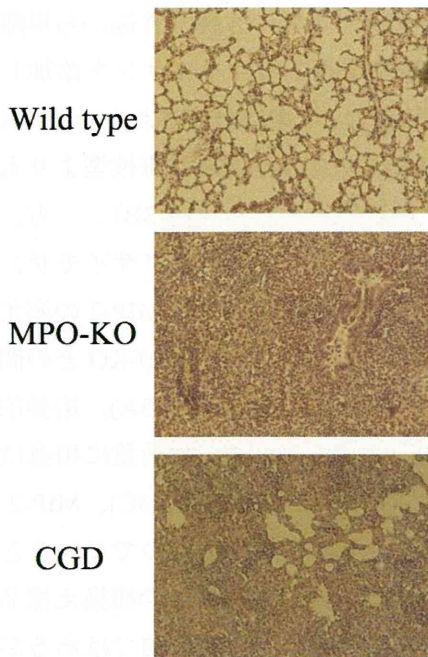


図5 カンジダ死菌投与後6日目の肺炎像

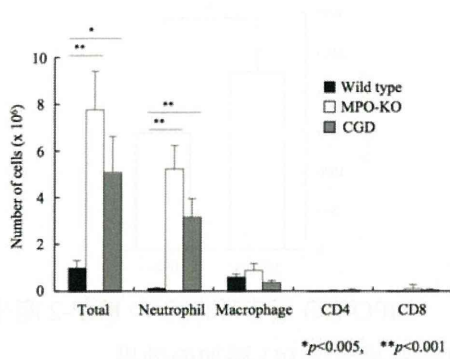


図6 カンジダ死菌投与4日目のマウスから肺胞洗浄によって回収された細胞種

投与後4日目の野生型マウス肺から肺胞洗浄によって回収された細胞数は、およそ100万個であったのに対し、MPO-KOマウスとCGDマウスの肺からは、それぞれ8倍量と5倍量の細胞が回収された(図6)。回収された細胞種を同定したところ、ザイモ

ザンを投与していない対照群では、いずれのマウスも回収された細胞のおよそ9割が常在性マクロファージであったのに対し(結果未提示)、カンジダ死菌投与4日目では、MPO-KOマウスもCGDマウスも7割あるいはそれ以上が好中球であることが判明した。マクロファージ数はカンジダ死菌非投与時とほとんど変化はなく、ヘルパーT細胞(CD4⁺)および細胞傷害性T細胞(CD8⁺)の集積は、投与後4日間の実験期間ではほとんど認められなかった。以上のようにMPO-KOマウスもCGDマウスも野生型マウスに比べて重篤な炎症を引き起こすが、少なくともカンジダ死菌投与4日目においては、MPO-KOマウスの方がCGDマウスよりも僅かながら炎症の進行が速かった。

以上の結果から、好中球からの活性酸素異常は、単に殺菌能の低下による炎症の誘発を導くだけでなく、菌体成分による炎症の誘発も助長することが示された。

D. 考察

CGD患者は易感染を起こす。また、MPO-KOマウスやCGDマウスも殺菌力が極度に低下しているために、カンジダ菌感染によって重篤な肺炎が生じてしまうことも、以前に明らかにしている。ところが、ザイモザンやカンジダの死菌でも、MPO-KOマウスやCGDマウスの方が野生型マウスに比べて肺炎が重篤となるという興味深い結果が得られ、食細胞からの活性酸素産生異常は、炎症を助長することが分かった。また、この炎症の少なくとも初期段階は好中球性であり、リンパ球系細胞はこの炎症にほとんど関与していないことも明らかになった。好中球や単球などが組織

に浸潤する際には、種々のサイトカインやケモカインが関与している。ザイモザン投与後6時間のMPO-KOマウスのMIP-2量が、野生型マウスよりも顕著に増加したことなどから、MIP-2量が一過的に上昇することが肺炎重篤化の一因と考えられた。カンジダ死菌誘発性肺炎においても、またCGDマウスにおいても同様のメカニズムで肺炎が重篤化するのかどうか、さらにMPO欠損によってMIP-2産生量が増大する分子機構の解明が重要であり、この解明は炎症疾患の発症機序の解明の一助となる。

活性酸素が細胞傷害性を持つという従来の知見から、スーパーオキシドや次亜塩素酸を産生できないCGDマウスやMPO-KOマウスの方が野生型よりも炎症は軽度であると考えるのが一般的である。したがって、この3年間の研究期間で予想とは逆の結果が得られたことはたいへん興味深い。

E. 結論

食細胞からの活性酸素産生を欠如する食細胞機能異常マウスは、生きたカンジダ菌が感染した時だけでなく、死菌に暴露しても重篤な肺炎を発症することが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takeuchi, K., Umeki, Y., Matsumoto, N., Yamamoto, K., Yoshida, M., Suzuki, K., and Aratani, Y.: Severe neutrophil-mediated lung inflammation in myeloperoxidase-deficient mice exposed to

zymosan. *Inflamm. Res.*, in press.

- 2) Sugamata, R., Dobashi, H., Nagao, T., Yamamoto, K., Nakajima, N., Sato, Y., Aratani, Y., Oshima, M., Sata, T., Kobayashi, K., Shoji Kawachi, Nakayama, T., and Suzuki, K: The contribution of neutrophil-derived myeloperoxidase in early phase of fulminant acute respiratory distress syndrome induced by influenza virus infection. *Microbiol. Immunol.* in press.
- 3) Phung, T., Sugamata, R., Uno K. Aratani, Y., Ozato, K., Kawachi, S., Nguyen, L., Nakayama, T., and Suzuki, K: Key role of RANTES (regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted), nonstructural protein1 and myeloperoxidase in cytokine storm induced by influenza virus PR-8 (A/H1N1) infection in A549 bronchial epithelial cells. *Microbiol. Immunol.* 55, 874-884 (2011).
- 4) Nagao, T., Suzuki, K., Utsunomiya, K., Matsumura, M., Saiga, K., Wang, P., Minamitani, H., Aratani, Y., Nakayama, T., Suzuki, K: Direct activation of glomerular endothelial cells by anti-moesin activity of anti-myeloperoxidase antibody. *Nephrol. Dial. Transplant.* 26, 2752-60 (2011)

2. 学会発表

国際会議

- 1) Kazuhiro Takeuchi, K., Umeki, Y., Matsumoto, N., Yamamoto, K., Yoshida, M., Suzuki, K., and Aratani, Y.: Myeloperoxidase deficiency enhances lung inflammation in mice exposed to zymosan. The Asia Pacific

Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop
2012, Mar 28-31, Tokyo, Japan (予定)

- 2) Nagao, T., Suzuki, K., Aratani, Y., Wang, P., Nakayama, T., and Suzuki, K: Murine crescentic glomerulonephritis model using anti-MPO and anti-LAMP2 antibodies. 14th International Congress of Immunology. August 22, 2010, Kobe, Japan
- 3) Aratani, Y., Umeki, Y., Nishikawa, N., Tozuka, S., Yoshida, M., Suzuki K: Myeloperoxidase deficiency enhances zymosan-induced acute lung inflammation by up-regulating KC and MIP-2. 7th International Peroxidase Meeting, USA, 2009. 4.
- 4) Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Maeda, N., Koyama, H., Suzuki, K: *In vivo* role of myeloperoxidase for the host defense against fungi. The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology, 2009. 5.
- 5) Nagao, T., Dobashi, H., Yamamoto, K., Nakajima, N., Sato, Y., Tomizawa, K., Aratani, Y., Jun, Z., Todaka, R., Oshima, M., Sata, T., Kobayashi, K., Kawachi, S., Nakayama, T., Suzuki, K: Role of Neutrophils and Myeloperoxidase in Lung Injury induced by Influenza A/H1N1 (PR-8) Infection in Mice. 14th International Vasculitis and ANCA Workshop, Denmark, 2009.6.

国内会議

- 1) 長尾朋和、土橋英紀、山本紀一、中島典子、佐藤由子、荒谷康昭、鄒軍、戸高玲子、大島正道、佐多徹太郎、小林一夫、河内正治、中山俊憲、鈴木和男: インフル

エンザ感染誘導による劇症型 ARDS モデルマウスの作製とその発症機構の解析。

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 (京都)

- 2) 長尾朋和、土橋英紀、山本紀一、中島典子、佐藤由子、富澤一夫、荒谷康昭、鄒軍、戸高玲子、大島正道、佐多徹太郎、小林和夫、河内正治、中山俊憲、鈴木和男: インフルエンザウイルス PR-8(H1N1) 感染による肺傷害機構の解析。第 20 回日本生体防御学会学術総会 2009 年 7 月 (東京)
- 3) 吉田后那、山本桂、鈴木和男、荒谷康昭: ミエロペルオキシダーゼ欠損好中球のケモカイン産生能の解析。第 15 回 MPO 研究会 2009 年 11 月 (栃木)
- 4) 荒谷康昭: The Structure and Function of Myeloperoxidase. 第 15 回 MPO 研究会 2009 年 11 月 (栃木)
- 5) Tomizawa, K., Nagao, T., Sugamata, R., Aratani, Y., Kobayashi, K., Kawachi, S., Nakayama, T., Suzuki, K: Role of neutrophils and myeloperoxidase in lung injury induced by influenza A/H1N1 (PR-8) Infection in Mice. 第 39 回日本免疫学会学術集会 2009 年 12 月 (大阪)
- 6) 荒谷康昭、吉田后那: 好中球機能異常による炎症性腸疾患の解析。第 17 回食細胞機能異常症研究会 2009 年 12 月 (東京)
- 7) 山本 桂、吉田后那、鈴木和男、荒谷康昭: ミエロペルオキシダーゼ欠損マウス好中球のケモカイン産生能の促進。2010 年度日本農芸化学会大会 2010 年 3 月 (東京)
- 8) 松本典子、吉田后那、荒谷康昭: ミエロペルオキシダーゼ欠損マウス好中球のザ

- イモザン貪食能の促進。2010 年度日本農芸化学会大会 2010 年 3 月 (東京)
- 9) 竹内一博、荒谷康昭：ミエロペルオキシダーゼ欠損によるザイモザン誘発性肺炎の重篤化機構の解析。第 21 回 日本生体防御学会学術総会 2010 年 7 月 (仙台)
- 10) 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 日本生体防御学会学術総会 2010 年 7 月 (仙台)
- 11) 菅又龍一、長尾朋和、土橋英紀、山本紀一、富澤一夫、中島典子、佐藤由子、荒谷康昭、大島正道、佐多徹太郎、小林和夫、河内正治、中山俊憲、鈴木和男：インフルエンザによる劇症呼吸障害の発症メカニズムの解明。第 21 回 日本生体防御学会学術総会 2010 年 7 月 (仙台)
- 12) 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 (仙台)
- 13) 菅又龍一、土橋英紀、長尾朋和、山本紀一、富澤一夫、中島典子、佐藤由子、荒谷康昭、戸高玲子、山崎祐自、月田早智子、大島正道、佐多徹太郎、小林和夫、河内正治、中山俊憲、鈴木和男：インフルエンザ誘導性の劇症肺炎において肺傷害に関わる MPO 機能の解析と MPO 放出阻害活性をもつマクロライドを用いたインフルエンザ新規治療薬の探索。第 16 回 MPO 研究会 2011 年 1 月 (仙台)
- 14) 梶村南美、戸塚彩子、三浦典子、大野尚仁、荒谷康昭：ミエロペルオキシダーゼ欠損マウス及び CGD マウスにおけるカンジダ死菌肺炎の誘発。2011 年度日本農芸化学会大会 2011 年 3 月 (京都)
- 15) 竹内一博、梅木 佑、山本 桂、鈴木和男、荒谷康昭：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における MIP-2 と KC の関与。2011 年度日本農芸化学会大会 2011 年 3 月 (京都)
- 16) 松本典子、山本 桂、荒谷康昭：ミエロペルオキシダーゼ欠損マウス好中球の MIP-2 産生機構の解析。2011 年度日本農芸化学会大会 2011 年 3 月 (京都)
- 17) 大河内善史、荒谷康昭、宮脇奈那、佐々木真理、鈴木和男、岡村康司：感染防御機構における電位依存性プロトンチャネル VSOP の役割の解析。近畿生理学談話会、2011 年 10 月 (大阪)
- 18) 荒谷康昭、三浦典子、大野尚仁、鈴木和男：真菌感染防御における好中球由来の活性酸素の役割。第 55 回日本医真菌学会学術集会、2011 年 10 月 (東京)
- 19) 荒谷康昭、本目みずき、三浦典子、大野尚仁：ミエロペルオキシダーゼ欠損マウスのカンジダ死菌による肺炎の重篤化。第 17 回 MPO 研究会、2011 年 10 月 (熊本)
- 20) Phung, T., 菅又龍一、宇野加津子、荒谷康昭、Ozato, K., 河内正治、Nyuyen, L., 中山俊憲、鈴木和男：劇症型 ARDS のインフルエンザウイルス NS1 と MPO が連続する cytokine-chemokine 誘導の亢進はサイトカインストームに貢献している。第 17 回 MPO 研究会 2011 年 10 月 (熊本)
- 21) Kazuhiro Takeuchi, K., Umeki, Y., Matsumoto, N., Yamamoto, K., Yoshida, M., Suzuki, K., and Aratani, Y: Severe neutrophil-mediated lung inflammation in myeloperoxidase-deficient mice exposed to