

第40回補体シンポジウム

講演抄録集

Abstracts

会 期：2003年8月22日(金)・23日(土)

会 場：ニュースカイホテル

熊本市東阿弥陀寺町2番地 TEL：096-354-2111

集会長：熊本大学大学院医学薬学研究部分子病理学分野

山 本 哲 郎

〒860-0811 熊本市本荘2-2-1

TEL：096-373-5307 FAX：096-373-5308

第40回補体シンポジウム参加案内

受付	第1日	8月22日(金)	午前8:00より
	講演会場	ニュースカイホテル(1階 若草の間)	
参加費	一般		3,000円
	学生		2,000円
	合同シンポジウムのみ参加		1,000円
	懇親会費		3,000円
年会費	年会費を未納の方、および新たに入会される方は、当日、年会費受付にてご納入下さい。		
発表方法	全て口頭発表。一般演題は討論も含めて約15分を予定しています。 35mmスライド用プロジェクター、もしくは液晶プロジェクターのいずれか1台を御使用になれます。 発表30分以上前までに、スライド受付を済ませてください。		
運営委員会	第1日	8月22日(金)	16:30~17:30(25階 特別室)
懇親会	第1日	8月22日(金)	18:00~20:30(25階 レストラン)
総会	第2日	8月23日(土)	13:00~13:30(1階 若草の間)

〔会場案内〕

ニュースカイホテル 熊本市東阿弥陀寺町2番地

TEL : 096-354-2111 又は 0120-354-211

FAX : 096-354-8973

<http://www.ananet.or.jp/anahotels/>

会場への交通手段

- JR 熊本駅から車で3分
- 熊本空港よりリムジンバスで45分（ニュースカイホテル前下車）
- 熊本交通センターより市バス（⑱, ⑳番）で7分
（祇園橋バス停下車 徒歩1分）
- 市電 祇園橋電停下車 徒歩2分



〔宿 泊〕

ニュースカイホテル：シンポジウム参加者特別価格：6,000円(朝食込；消費税別)

各自、電話またはFAX（返信先をご明記）でご予約下さい。

ご予約時には、『第40回補体シンポジウム参加者』である旨、ご明示下さい。

（尚、ホテルでは客室からのパーソナルコンピューターによる通信が可能です。）

第40回補体シンポジウム 日程表

8月22日 (金) 若草の間	8月23日 (土) 若草の間
9:00~9:10 開会の辞	9:00~10:40 セッションD (C5a、免疫・防御関連) 座長 阿部正義 岡田則子
9:10~10:30 セッションA (レクチン関連) 座長 松下 操 今村隆寿	10:40~11:00 コーヒーブレイク
10:30~10:50 コーヒーブレイク	11:00~12:00 特別講演 演者 Peter N. Monk 座長 岡田秀親
10:50~12:10 セッションB (制御因子関連) 座長 遠藤守人 松本美佐子	12:00~13:00 昼 食
12:10~13:40 昼 食	13:00~13:30 総 会
13:40~14:40 教育講演 演者 後藤祐児 座長 木下タロウ	13:30~16:30 合同シンポジウム「膠原病と補体」 座長 堀内孝彦 菅 守隆
14:40~15:00 コーヒーブレイク	16:30~16:40 閉会の辞
15:00~16:20 セッションC(系統発生・遺伝子関連) 座長 野中 勝 西浦弘志	
16:30~17:30 運営委員会 (25階特別室)	
18:00~20:30 懇親会 (25階ホール)	

第40回補体シンポジウム・学術プログラム

第1日 8月22日 (金)

セッションA (レクチン関連)

9:10 ~ 10:30

座長 松下操、今村隆寿

- A1** L-ficolin/P35 のアポトーシス細胞へ結合による補体レクチン経路の活性化
藏屋幹夫¹、Zhenping Ming²、Xianzhou Liu³、松下操⁴、藤田禎三¹
(¹福島県立医科大学生化学第二講座、²武漢医科大学寄生虫学講座、³武漢医科大学微生物講座、⁴東海大学工学部生命化学科)
- A2** MBL と種々の IgA および免疫グロブリンとの結合性
寺井格¹、小林邦彦²、J-P Vaerman³、真船直樹⁴
(¹北海道医療大学医療科学センター、²北海道大学小児科、³Dept. Exp. Med. Univ. Louvain、⁴酪農学園大学酪農学部)
- A3** Expression of Ficolin A and Ficolin B in Adult Mouse and Developing Embryo
Yu Liu¹、Yuichi Endo¹、Shunsaku Homma²、Kazuko Kanno¹、Hiroyuki Yaginuma²、Teizo Fujita¹
(¹Department of Biochemistry and ²Department of Anatomy, Fukushima Medical University)
- A4** ヤツメウナギ MBL のタンパク精製と構造の決定
高橋百恵¹、松下操²、松下亜紀子¹、遠藤雄一¹、藤田禎三¹
(¹福島県立医科大学 医学部 生化学第二講座、²東海大学 工学部 生命化学科)
- A5** インテレクチンファミリーに属するヤツメウナギ血清レクチン
松下亜紀子、遠藤雄一、中田宗宏¹⁾²⁾、松下操¹⁾²⁾、藤田禎三
(福島県立医大・医・二生化、¹⁾東海大・工・生命化学、²⁾糖鎖工学研究施設)

セッションB (制御因子関連)

10:50 ~ 12:10

座長 遠藤守人、松本美佐子

- B1** PIG-W is critical for inositol acylation but not for flipping of glycosylphosphatidylinositol-anchor.
Uamporn Siripanyaphinyo, Yoshiko Murakami, Ji Young Kang, Sonoko Ishihara¹, Hideki Nakakuma¹, Yusuke Maeda and Taroh Kinoshita
(Department of Immunoregulation, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, ¹The Second Department of Medicine, Kumamoto University School of Medicine)

- B2** DAFによるNK細胞依存性細胞傷害の抑制について
 久保 朋子^{1),2)}、宮川周士¹⁾、日馬多美子¹⁾、福田大輔¹⁾、松浪勝義^{1),2)}、白倉良太¹⁾
 (¹⁾大阪大学大学院医学系研究科・組織再生医学講座・臓器置換、²⁾日本動物工学研究所 (AERI))
- B3** ヒト肺組織と非小細胞肺癌における新しい DAF variants
 大須賀文彦¹⁾、遠藤雄一²⁾、樋口光徳¹⁾、管野隆三¹⁾、寺島雅典¹⁾、藤田禎三²⁾、
 後藤満一¹⁾
 (¹⁾福島県立医科大学第一外科学講座、²⁾福島県立医科大学第二生化学講座)
- B4** Peanut Agglutinin(PNA)認識糖蛋白としての Decay-Accelerating Factor(DAF)の
 同定と非小細胞肺癌における発現
 樋口光徳¹⁾、遠藤雄一²⁾、鈴木弘行¹⁾、大須賀文彦¹⁾、塩 豊¹⁾、藤生浩一¹⁾、
 管野隆三¹⁾、寺島雅典¹⁾、藤田禎三²⁾、後藤満一¹⁾
 (福島県立医大・医・¹⁾第1外科、²⁾第2生化)
- B5** ニワトリの RCA(regulator of complement activation)遺伝子産物の構造・機能解析
 信田京子、押海裕之、石井一夫、松本美佐子、瀬谷司、
 (大阪府立成人病センター研究所 免疫学部門)

教 育 講 演 13 : 40 ~ 14 : 40

座 長 木下タロウ

蛋白質のフォールディング — その正常と異常
 後藤 祐児 (大阪大学蛋白質研究所)

セッションC (系統発生・遺伝子関連) 15 : 00 ~ 16 : 20

座 長 野中 勝、西浦弘志

- C1** 尾索動物カタユレイボヤゲノムからの補体系遺伝子探索
 吉崎 史子¹⁾、Isidore Rigoutsos²⁾、野中 勝¹⁾
 (¹⁾東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻、²⁾IBM Thomas J. Watson Research Center)
- C2** ドチザメ C3/C4/C5 cDNA のクローニング
 竹本忠司、寺戸勲雄、野中真弓¹⁾、木村博、野中勝¹⁾
 (滋賀医科大学・放射線基礎医学講座、¹⁾東京大学大学院理学系研究科・生物科学専攻)
- C3** コイ補体における C3d フラグメントの生成および C3d レセプターの検出
 中尾実樹、三浦知歌子、井藤俊亮、中原マキ子、奥村啓子、矢野友紀
 (九州大学大学院農学研究院)

- C4** 発作性夜間血色素尿症(PNH)における異常クローン拡大に関わる候補遺伝子
 泉井朋久¹⁾、桑山真輝²⁾、西村純一³⁾、待井隆志⁴⁾、金倉 譲²⁾、木下タロウ¹⁾、
 井上徳光⁵⁾
 (¹⁾大阪大学微生物病研究所免疫不全、²⁾大阪大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科学、
³⁾デューク大学医学部血液学、⁴⁾那智勝浦町立温泉病院内科、⁵⁾大阪府立成人病センター
 研究所分子遺伝学部門)
- C5** ヒト補体成分 *C1R* 遺伝子のエクソン-イントロン構造と遺伝子多様性の解析
 中川真由美、湯浅 勲
 (鳥取大学医学部病態検査学講座、同医学部法医学分野)

第2日 8月23日(土)

セッションD (C5a、免疫・防御関連)

9:00 ~ 10:40

座長 阿部正義、岡田則子

- D1** 補体 C5a による摂食促進機構
 大日向耕作、高木恭仁子、美谷島杏子、浅川明弘¹、乾 明夫¹、吉川正明
 (京都大学大学院農学研究科、¹神戸大学大学院医学系研究科)
- D2** アナフィラトキシン C5a の活性阻害相補性ペプチドの解析
 藤田恵美子、Farkas Imre、岡田秀親、岡田則子
 (名古屋市立大学大学院医学研究科・生体防御学)
- D3** C5a 走化性リセプターに対する細菌由来のリガンド、Skp
 施 磊、アージュン・シュレスタ、棚瀬純男、西野憲和*、山本哲郎
 (熊本大学大学院医学薬学研究部、*九州工業大学大学院生命科学システム工学研究科)
- D4** 麻疹ウイルス株による樹状細胞の応答性の差異 -CD46 依存性の株のみが
interferon-inducible genes を発現誘導する -
 谷口光恵、田辺真佐子、Nasim Ara Begum、新開大使、松本美佐子、瀬谷司
 (大阪府立成人病センター研究所免疫学部門)
- D5** HIV-1 感染細胞に細胞死を誘導するヒト IgM モノクローナル抗体の解析
 金原紀章 土肥名月 朝井鈴佳 尹淑萍¹ 岡田秀親 岡田則子
 (名古屋市立大学大学院医学研究科・生体防御学、¹Dept of Pathology, Wayne Stated
 University School of Medicine)
- D6** 家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)における免疫療法
 寺崎久泰、安東由喜雄¹、原岡克己、佐々木裕
 (熊本大学大学院医学薬学研究部消化器内科学、¹生態情報機能解析学)

特別講演

11:00 ~ 12:00

座長 岡田 秀親

Complement Fragment Receptors: Inside and Outside the Immune System

Peter N. Monk, PhD

(Academic Neurology Unit, University of Sheffield, UK.)

合同シンポジウム (補体研究会・熊本膠原病研究会)

13:30 ~ 16:30

「 膠原病と補体 」

オルガナイザー・座長 堀内孝彦、菅 守隆

S1 補体欠損症と膠原病

堀内孝彦、塚本浩、宮川弘、姫路大輔、永江祥之介¹、北野悦子²、北村肇²、
林健志³、原田実根

(九州大学大学院病態修復内科学分野 (第一内科)、¹九州大学大学院皮膚科学、²大阪府立看護
大学医療技術短期大学部臨床検査学科、³九州大学生体防御医学研究所)

S2 膠原病における RP105 陰性 B 細胞の役割

小荒田秀一、菊池裕治²、春田善男、牛山理、多田芳史、堀内孝彦²、
大田明英³、長澤浩平

(佐賀医科大学内科、³同看護学科、²九州大学医学部第一内科)

S3 補体 C3b/CD46 による regulatory T の誘導と自己免疫疾患

瀬谷 司

(大阪府立成人病センター研究所, JST, CREST (免疫難病))

S4 ループス腎炎と補体

関根英治

(福島県立医科大学医学部第二内科、米国サウスカロライナ医科大学)

S5 膠原病と補体 — 補体制御による膠原病の治療戦略

松尾清一、森田良樹、志水英明、丸山彰一、¹水野正司

(名古屋大学大学院病態内科学、¹ウエールズ大学医学部生化学)

Complement Fragment Receptors : Inside and Outside the Immune System

Peter N Monk

Academic Neurology Unit, University of Sheffield, UK.

The chemoattractant receptor subfamily. The well-known receptors for complement fragments C5a (C5aR, CD88) and C3a (C3aR) are members of the G protein coupled receptor superfamily. In the same subfamily are C5L2 (GPR77), ChemR23 (Dez, chemokine receptor like-1) and the orphan receptor GPR1. A characteristic feature of these receptors is the number of glutamate, aspartate and tyrosine residues in the extracellular N-terminus (except for C3aR, where the second extracellular contains this acidic region). In the case of C5aR and C3aR, these residues have been implicated in ligand binding.

Complement fragment receptor ligands. C5aR binds both C5a and its metabolite, C5a des-Arg⁷⁴ but C3aR binds only C3a. As the des-arginated derivatives of the complement fragments are the major forms found in the circulation, this indicates that C5aR is likely to be involved in both local and systemic responses to complement activation but C3aR is involved only in local responses. C5aR is also reported to bind cross-linked homodimers of ribosomal protein S19, a protein that has little sequence similarity with sequence to C5a. C5L2 has recently been shown to bind C5a and C5a des-Arg⁷⁴ with high affinity and, remarkably, also has a measurable affinity for C3a and C3a des-Arg⁷⁷, probably at a separate site to C5a. Peptide analogues of the C-terminal sequences of C5a and C3a are full agonists at C5aR and C3aR, respectively, and this has led to the development of potent peptidic agonists and antagonists, particularly of C5aR. One such antagonist, PMX-53 (F-[OPdChaWR]) from Promics Pty, is effective in animal models of several inflammatory

diseases, for example, antigen-induced arthritis in the rat. Several new non-peptidic antagonists have recently been announced, although data concerning their effects on inflammation *in vivo* is not yet in the public domain.

Ligand binding residues in complement fragment receptors. A definitive model of ligand binding to C5aR does not yet exist, but the evidence suggests separate ligand binding and receptor activation sites. The receptor N-terminus has a number of acidic and potentially sulphated tyrosine residues that interact with basic residues in the core domain of C5a, but inhibiting this interaction using antibodies or by deletion of the N-terminus of C5aR does not prevent receptor activation by synthetic peptide analogues of the C-terminus of C5a. The C-terminus of C5a binds to a receptor activation site located in the extracellular half of the transmembrane helical bundle of C5aR. Some of the residues that form this activation site have been identified by conventional mutagenesis studies: Arg²⁰⁶ on helix V, which may interact with the C-terminal carboxylate moiety of agonist peptides and Asp²⁸² on helix VII, which interacts with the side-chain of Arg⁷⁴. Arg¹⁷⁵ (helix V) and Glu¹⁹⁹ in the second extracellular loop are also involved in ligand binding. A powerful yeast-based random mutagenesis system has been recently exploited to define residues involved in interactions with agonist and antagonist peptides. Ile¹¹⁶ in helix III and Val²⁸⁶ in helix VII were postulated to form part of an activation switch that is blocked by antagonist peptide. A proposed ligand-binding

特別講演

model used interactions with Ile¹¹⁶ and Arg²⁰⁶ to dock an antagonistic hexapeptide with a known solution structure into C5aR modelled on rhodopsin. This placed the sidechain of the C-terminal Arg residue adjacent to a cluster of aromatic residues in the transmembrane bundle. However, this model does not fit with previous observations on the role of Asp²⁸² in ligand binding, and our recent work using the cyclic peptide antagonist PMX-53 indicates that Ile¹¹⁶ is not an essential residue for either agonist or antagonist activity at C5aR. The ligand binding mechanism of C3aR is very similar to C5aR, except that the enlarged second extracellular loop of C3aR contains acidic and potentially sulphated tyrosine residues that bind to the core domain of C3a. The activation sites on C3aR and C5aR are very similar, and several agonist peptides derived from the C5a C-terminus also activate C3aR. Much less is known about the ligand binding sites on C5L2; however, many of the key residues in C5aR are conserved in both the N-terminus and the transmembrane helices of C5L2, suggesting that the mechanism of ligand binding has some resemblance to C5aR. Recent work with peptide analogues has provided some clues about the complex ligand binding activity of C5L2.

Signalling by complement fragment receptors. C5aR and C3aR usually couple to pertussis toxin-sensitive G proteins (G₁₂, G₁₃) in myeloid and non-myeloid cells although C5aR has also been shown to couple to the toxin-insensitive G₁₆. In contrast, human C5L2 does not appear to be able to activate G proteins, and lacks the critical Arg residue in the highly conserved 'Asp-Arg-Tyr' motif found at the N-terminal end of the second intracellular loop in many G protein coupled receptors. C5L2 homologues from rat, mouse and chimpanzee also lack this Arg residue, suggesting that signalling through this receptor is likely to be non-G protein-dependent or perhaps completely absent.

Functions of complement fragment receptors. C5aR and C3aR have well-documented roles in myeloid cells and can stimulate chemotaxis,

degranulation and cytokine production. More recently, the expression of these receptors has been shown to be widespread, including non-myeloid cells such as endothelial and epithelial cells, articular chondrocytes, hepatocytes, oligodendrocytes and neurons. C3aR is expressed on many of the same cell types and also on astrocytes and haemopoietic stem cells. C5L2 is expressed at low levels on polymorphs, but not on monocytes or lymphocytes; in fact the highest levels of C5L2 expression seems to be on adipose tissue. The role of complement fragments in the immune system is clear, and so the expression of their receptors on immune, particularly myeloid, cells is fully explicable in these terms. Expression of receptors on non-myeloid cells may also have an immune function, for instance in regulating cytokine levels in organs distal to the complement activation site as a part of a systemic protective response during inflammation. However, complement fragments and their receptors may also have functions unrelated to complement-mediated immunity. Many complement components are synthesised locally, for instance in the brain or in adipose tissue, leading to the suggestion that C5a and C3a could be generated as a part of a juxtacrine signalling system. This hypothesis has received strong support from studies on adipocytes, where C3a and C3a des-Arg⁷⁷ are known to stimulate triglyceride synthesis, possibly through C5L2. The components for the generation of these fragments are made by the adipocytes, and so this is may be a function of complement that is entirely separate from the innate immune response. Recent data from studies on rat pituitary function *in vivo* and *in vitro* also supports the view that complement fragment receptors may have functions outside of the immune system.

蛋白質のフォールディング — その正常と異常

後藤 祐児

大阪大学蛋白質研究所

Protein folding and misfolding in physiological and pathological processes

Yuji Goto

Institute for Protein Research, Osaka University

<はじめに>

蛋白質はアミノ酸のつながった“ひも”であり、ひもは折りたたまれて機能を果たす⁽¹⁾。蛋白質の折りたたみには折り紙と似たイメージがある。折り紙が英語でペーパー・フォールディング (paper folding) であるのに対して、蛋白質の折りたたみは、プロテイン・フォールディング (protein folding) と呼ばれる。共に広がった状態がコンパクトになって、機能的なネイティブ構造 (native structure) ができあがる。大きな違いは、折り紙では同じ一枚の紙からいろいろな形を折ることができるが、蛋白質の折り紙では、それぞれの蛋白質のアミノ酸の配列 (一次構造) は異なり、ネイティブ構造も異なる。そして、一次構造が決まれば立体構造も決まると考えられてきた。このような概念は、それを提唱した研究者の名前にちなみ、“アンフィンゼン (Anfinsen) のドグマ” と呼ばれる。このドグマに従うと、遺伝子配列が決まれば蛋白質の一次構造は決まり、立体構造も一義的に決まる。ところが近年、アンフィンゼンのドグマに従わない蛋白質の存在することが明らかになっている^(2, 3)。アンフィンゼンのドグマに従う蛋白質の昼の世界と、それに従わない夜の世界を紹介する。

1. 蛋白質の百花繚乱

蛋白質の折りたたみ反応をフォールディングというのに対して、折りたたまれた後の形やトポロジーはフォールドと呼び、区別する。蛋白質には約 1000 種類程度のフォールドがある。特にさまざまな蛋白質で頻繁に出現するものはスーパーフォールドとよばれる。スーパーフォールドに示されるような蛋白質の立体構造を見ていると、“百花繚乱” というこ

とばが思い浮かぶ。

2. ミスフォールディング

近年、蛋白質のネイティブ構造が変性したり、まちがってフォールディング (ミスフォールディング) した構造をとることが原因で病気が引き起こされる例が多く見つかри、フォールディング病 (folding disease) として注目されている。これらの中には蛋白質が幅 10 nm で枝分かれのない線維構造をつくって体内に沈着している例が多くある。これをアミロイド線維と呼び、アミロイド線維の沈着する疾患をアミロイドーシスという。約 20 種類のタンパク質とそれの関わる疾患が知られている。これらには、アルツハイマー病や、日本でも見つかリ大きな社会問題となっている狂牛病などのプリオン病も含まれる。

3. 透析アミロイドーシス

具体的な例として著者たちが研究を行っている β_2 ミクログロブリンを例にとって、アミロイド線維を紹介しよう⁽³⁾。人工血液透析は重い腎疾患の患者に対して、本来腎臓が行っている血液透析機能を人工的に行う医療である。ところが 10 年以上の長期透析患者の多くに手根管症候群と呼ばれる肩や手首の痛みや運動障害を伴う症状があらわれる。原因は β_2 ミクログロブリンが形成するアミロイド線維の沈着である。 β_2 ミクログロブリンは、一旦変性した後、形を変えてアミロイド線維を形成していると考えられている。試験管の中では、患者から精製したアミロイド線維をシードとして、酸変性させた β_2 ミクログロブリンを加えると、アミロイド線維を形成することができ

教育講演

る。しかし、生体内で線維ができる詳細なしくみはわかっていない。

β_2 ミクログロブリンのアミロイド線維は幅が 15 nm、長さが 1-2 μm の針状構造をしている。やわらかさの強調されることの多い蛋白質がこのように鋭い、しかも幅のそろった棒状構造をつくることは驚きである。筆者たちは核磁気共鳴を用いた構造研究から、天然構造が一旦ほどけた後、広範囲にわたる水素結合ネットワークが形成されて、極めて剛直で安定なアミロイド線維構造ができあがっていることを提案した^(4,5)。

アミロイド線維の一般的な特徴は均質な針状構造であるが、詳細は各アミロイド線維によって異なる。さまざまなアミロイド線維を並べてみると、天然構造が多様であるように、アミロイド線維も多様であることがわかる。

4. 蛋白質の陰翳礼讃

折り紙の例えでいうならば、蛋白質機能を担うネイティブ構造はきれいに折りあがったツルやカメの世界である。折り手が下手で折り紙に失敗したり、たとえうまくできた折り紙であっても古くなって変性したりした場合には、丸めてゴミ箱に捨てれば終わりのはずであった。ところがゴミ箱の底をよく見ると、紙くずに混じって、針やはさみ、さらにはナイフがあるという、従来の概念からは信じられないことが起きていたのである。蛋白質の立体構造には、機能を担う表の世界とは違う裏の世界があったのである。

これまで私たちが注目してきたのは蛋白質の機能と直結した華やかな表の世界であり、アミロイド線維は裏の世界の蛋白質の姿である。表の世界が百花繚乱であるならば、蛋白質の暗い夜の世界にうごめくさまざまな姿は“蛋白質の百鬼夜行”とでもいえるのであろうか。これらが徘徊する蛋白質の夜の世界は、病気や老化とつながる蛋白質の陰鬱（いんうつ）とした世界である。

しかしながら、アミロイド線維のさまざまな形をじっと眺めていると、それはそれで大変美しい。谷崎潤一郎のエッセイに“陰翳礼讃”（いんえいらいさん）というのがある。谷崎は陰や闇の中に浮かび

上がるほのかな陰影やあざやかさが日本美の原点であると考えた。アミロイド線維の世界については、今は病気と関係する面がクローズアップされている。しかし、アミロイド線維が悪者で終わってしまうとは思いたくない。蛋白質がとりうる基本的形態であるならば、生命にとって有利に働いてきたこともあるに違いない。さらには、アミロイド線維はナノテクノロジーの素子として実に興味深い。一寸法師の針の剣を鞘に納めて、必要なときだけ剣を抜くことができれば、ナノテクノロジーの強力な武器になる。これまで知らなかった蛋白質の夜の世界には、“蛋白質の陰翳礼讃”がぴったりではないだろうか。

<おわりに>

これまでの蛋白質研究は、蛋白質の昼の世界を対象としてきた。蛋白質に夜の世界があり、そこでの構造が病気と重要な関わりのあること、しかしながら、将来はそれらを利用できるかも知れないことを認識すると、夜の世界の蛋白質を研究することは、華やかなネイティブ構造を決めることと同じように重要である。

謝辞

本研究は、星野大（阪大・蛋白研）、内木宏延（福井医科大）各氏との共同研究である。

<文 献>

1. 後藤祐児・谷澤克行. (2000) *タンパク質の分子設計* (後藤・谷澤編), pp. 1-35, 共立出版.
2. 後藤祐児・星野大. (2002) *蛋白質核酸酵素* 47, 663-669.
3. 後藤祐児. (2003) *実験医学* 21, 898-902.
4. Hoshino, M., Katou, H., Hagihara, Y., Hasegawa, K., Naiki, H. & Goto, Y. (2002) *Nature Struct. Biol.* 9, 332-336.
5. Katou, H., Kanno, T., Hoshino, M., Hagihara, Y., Tanaka, H., Kawai, T., Hasegawa, K., Naiki, H. & Goto, Y. (2002) *Protein Sci.* 11, 2218-2229.

補体欠損症と膠原病

堀内孝彦、塚本浩、宮川弘、姫路大輔、永江祥之介¹、北野悦子²、北村肇²、林健志³、原田実根
九州大学大学院病態修復内科学分野（第一内科）、¹九州大学大学院皮膚科学、²大阪府立看護大学医療技
術短期大学部臨床検査学科、³九州大学生体防御医学研究所

Complement deficiency and collagen diseases

Takahiko Horiuchi, Hiroshi Tsukamoto, Hiroshi Miyagawa, Daisuke Himeji, Shonosuke Nagae, Etsuko Kitano,
Hajime Kitamura, Kenshi Hayashi, Mine Harada

Medicine and Biosystemic Science and ¹Department of Dermatology, Kyushu University Graduate School of
Medical Sciences; ²Department of Medical Technology, Osaka Prefectural College of Health Sciences; ³Medical
Institute of Bioregulation, Kyushu University

<はじめに>

膠原病とくに全身性エリテマトーデス(SLE)の病因には、自己抗原の過剰な蓄積にともなう自己抗体の出現が重要であることが明らかになってきた。自己抗原の蓄積の原因として、1) 産生の亢進、2) 除去の低下、の2つが考えられる。従来補体は自己抗体により活性化されて膠原病に対して促進因子、増悪因子として働くと考えられてきたが、近年のノックアウトマウスを用いた研究で、C1q、C2、C4などの補体前期成分に属する分子は自己抗原の除去にも働いており、むしろ改善因子、防御因子であることがわかってきた。自己抗原の蓄積に関連した分子の異常について膠原病患者で検討してきた結果を補体を中心に報告する。

<方法>

- 1) 遺伝子解析：膠原病患者、健常人の末梢血よりDNAを分離し、PCR-SSCP法、PLACE-SSCP法、direct sequence法を行なって解析した。
- 2) タンパク解析：ELISA法、Western blot法、哺乳細胞へのtransfectionなどを行なって解析した。

<結果>

1) 補遺伝子の一塩基多型(SNP)の解析：自己抗原の蓄積に関連すると考えられる補体遺伝子、アポトーシス、リンパ球シグナル伝達分子などについて、現在までに33分子の全エクソンとプロモーター領域について遺伝子多型の有無の検討を行なった。合計190個の一塩基多型(SNP)を同定した。

2) 疾患関連解析、機能解析：Mannose binding lectin (MBL)、caspase-8など一部の分子のSNPについて膠原病患者における疾患関連解析を行なった。欧米ではMBLと膠原病との関連を示唆する報告が多いが、我々の患者では関連を認めなかった¹⁾。またいくつかの分子について機能解析もあわせて行なった^{2,3)}。

<考察>

補体前期成分をはじめとした自己抗原の蓄積に関わるいくつかの分子の機能異常が、SLEなどの病因に関与することが示唆された。

- 1) Horiuchi T et al. Genes Immun 1:464, 2000
- 2) Horiuchi T et al. BBRC 272:877, 2000
- 3) Himeji D et al. Blood 99:4070, 2002

膠原病における RP105 陰性 B 細胞の役割

小荒田秀一、菊池裕治²⁾、春田善男、牛山理、多田芳史堀内孝彦²⁾、大田明英³⁾、長澤浩平
佐賀医科大学内科、³⁾同看護学科、²⁾九州大学医学部第一内科

B cells lacking RP105 expression in rheumatic diseases

Syuichi Koarada, Yuji Kikuchi, Yoshio Haruta, Osamu Ushiyama, Yoshifumi Tada

Takahiko Horiuchi, Akihide Ohta, Kohei Nagasawa

Department of Medicine and Nursing, Saga Medical School

First Department of Internal Medicine, Kyushu University

<はじめに>

最近、Toll-like receptor (TLR) の発見によって、自然免疫の重要性が再認識されている。RP105 は、分子量 105kDa の成熟 B 細胞・単球上に発現する TLR 関連分子の一つである。LPS レセプターとして、グラム陰性細菌感染において重要である。RP105 の発現には、MD-1 が必須であり、B 細胞上での LPS による B 細胞活性化には、TLR4 を同時に必要とする。抗 RP105 抗体刺激は、B 細胞の著しい増殖を起し、放射線や糖質ステロイドによるアポトーシスを抑制する。一方、B 細胞レセプター (BCR) と RP105 同時刺激は B 細胞アポトーシスを誘導する。この点から、RP105 は B 細胞の生・死の重要な制御因子でもある。機能的に、RP105 は B 細胞の抗体産生にも関与しており、RP105 の異常は自己免疫疾患との関連すると推測される。

我々は、各種膠原病での B 細胞上 RP105 の発現を検討し、自己免疫病態で RP105 陰性 B 細胞の果たす機能や病因との関連を考察した。

<方法>

各種膠原病患者より末梢血を採取し、直ちに比重遠心法を用いて単核細胞を単離した。抗 CD19、

抗 RP105 抗体による二重染色を行ったのちに、FACSscan にて B 細胞上の RP105 の発現を解析し、RP105 の発現が低下した B 細胞 (=RP105 陰性 B 細胞) 数を測定した。また、SLE では RP105 陰性 B 細胞数と臨床的な各種パラメーターや疾患活動性との相関を検討した。セルソーターを用いて RP105 陰性 B 細胞を分離した。同細胞を培養・刺激し、自己抗体・抗 DNA 抗体の産生を測定、病因との関連を考察した。シェーグレン症候群では、小唾液腺組織の抗 RP105 抗体による免疫染色を行い、浸潤 B 細胞の RP105 陰性細胞比率を求めた。皮膚筋炎・多発性筋炎 (DM/PM) では、末梢血 RP105 陰性 B 細胞の差、間質性肺炎合併例の肺胞洗浄液中 RP105 陰性 B 細胞数などの臨床的検討を行った。in vitro の実験として、RP105 陰性 B 細胞の細胞表面分子発現解析、デキサメサゾンによるアポトーシス感受性 (Annexin-V による多重染色後の FACS 解析)、各種刺激による RP105 分子発現の増減などの検討も行った。

<結果>

SLE 患者では RP105 陰性 B 細胞の増加が見られた。RP105 陰性細胞数と IgG 値は相関していた。

RP105 陰性 B 細胞数は SLEDAI などの疾患活動性と強く相関していた。初発患者例の経時的検討でも SLE の疾患活動期に RP105 陰性 B 細胞数は増加し、治療後はほぼ消失した。

RP105 陰性 B 細胞のフェノタイプは、細胞径増大、CD95 陽性、CD86 陽性を示し、活性化 B 細胞・胚中心 B 細胞・early plasma cell と類似した表現型であった。しかし、B 細胞活性化刺激では、RP105 の陰性化は誘導されず、単純な活性化 B 細胞とは異なっていると考えられた。また、細胞内染色では、細胞内に豊富な IgG クラスの抗体を産生していた。ステロイド誘導性アポトーシスの感受性は、RP105 陰性 B 細胞で高かった。我々は、セルソーターで分離した RP105 陰性 B 細胞が抗 ds-DNA 抗体の産生を行うことを見出した。また、RP105 陰性 B 細胞は IL-6 産生を行っている可能性も示唆された。

B 細胞の免疫異常が示唆されるシェーグレン症候群と DM においても、RP105 陰性 B 細胞数の増加が認められた。PM では RP105 陰性細胞数の増加はなかった。シェーグレン症候群における唾液腺組織へ浸潤した B 細胞の多くが、RP105 陰性 B 細胞であった。また、間質性肺炎を伴う DM 患者の気管支肺胞洗浄液中 B 細胞も多くが RP105 陰性であった。

<考察>

膠原病のなかで SLE、シェーグレン症候群、DM など B 細胞機能が深く関与するとされる疾患で、RP105 陰性 B 細胞の増加が見られた。SLE では、RP105 陰性 B 細胞数と疾患活動性はよく相関し、疾患活動性マーカーとしても有用であった。臨床的に RP105 陰性 B 細胞数の測定は、SLE の診断や治療効果の判定の参考となる。また、免疫学的に、RP105 陰性 B 細胞は、自己抗体産生細胞として重要なサ

ブセットを形成し、自己免疫病態・病因と深く関連していると考えられる。PM と DM は、従来同一疾患であるとの考えが強かったが、RP105 の発現の差からは、両疾患の免疫学的な相異が示唆される。

シェーグレン症候群の唾液腺組織や DM の間質性肺炎では、RP105 陰性 B 細胞の増加がみられ、局所の炎症形成における RP105 陰性 B 細胞の関与も示唆された。RP105 陰性 B 細胞は IL-6 を産生し、炎症の形成に関与している可能性も示唆されている。

RP105 陰性 B 細胞は、全身性の B 細胞活性化を反映するのみでなく、自己抗体産生 B 細胞サブセットとして病因論的にも重要であり、局所の炎症・組織障害と関連している可能性がある。自己免疫疾患において RP105 陰性 B 細胞は治療の標的のひとつであろう。

<結論>

RP105 陰性 B 細胞は、膠原病の病態を反映し、臨床上、活動性マーカーとして有用であるばかりでなく、自己抗体産生などの病因的意義も有している。自己免疫疾患の治療戦略において、RP105 陰性 B 細胞を標的とした治療法も考慮され、今後さらなる検討が必要とされている。

<文献>

- 1) Kikuchi Y, et al. Arthritis Rheum, 46: 3259 (2002)
- 2) Koarada S, et al. Rheumatology (Oxford), 40: 1315 (2001)
- 3) Kikuchi Y, Ann Rheum Dis, 60: 1137 (2001)
- 4) Koarada S, et al. Arthritis Rheum, 42: 2593 (1999)

補体 C3b/CD46 による regulatory T の誘導と自己免疫疾患

瀬谷 司

大阪府立成人病センター研究所, JST, CREST (免疫難病)

Induction of regulatory T cells by stimulation of peripheral blood lymphocytes with complement C3b and CD3.

Tsukasa Seya

Department of Immunology, Osaka Medical Center for Cancer and Cardiovascular Diseases, JST, CREST

補体欠損症に自己免疫疾患が多発することは以前から知られて来た。C3 までの前期補体成分の欠損症例に SLE の合併が多く報告されている。補体 C3b の免疫複合体可溶化などから補体には免疫複合体のクリアランスを促進する機能があり、補体欠損では免疫複合体が蓄積して自己免疫疾患の増悪に繋がることが示唆されて来た。しかし、補体が免疫複合体のクリアランスに *in vivo* で関与するというデータは殆どなく (1)、生理的意義が反復して問われてきた。

最近、Atkinson ら (2)、Horvat ら (3) は CD3 抗体と C3b によってリンパ球の TCR/CD46 を刺激すると TGF- β , IL-10 を産生するリンパ球画分が誘導されることを報告した。Macrophage CD46 刺激では NO 産生、IL-12p40, IL-10 の誘導が見られる (4,5)。従って、CD46 は第 3 の co-stimulator のようなシグナルレセプターとしてリンパ球では regulatory T, macrophage では特異な活性化状態に導くと推定される。Regulatory T も NO や IL-10 も自己免疫を抑制するはずである。

川野らは (6) SLE patients の血漿中の soluble CD46 (sCD46) 濃度を調べ、増悪期に sCD46 が増加し、寛解期に減少することを報告した。また、

sCD46 は補体価が低い患者さんほど高値を示した。このことは sCD46 が自己免疫—免疫複合体と関連して産生される因子である可能性を示唆した。しかし、この時期、まだ regulatory T の概念は確立されておらず、このような解釈は retrospective である。sCD46 産生が免疫複合体の原因の一部をなすか結果としての産物かも不明である。

CD46 が regulatory T を誘導する場合、C3b が樹状細胞に固定されてリンパ球 CD46 を刺激するような構図が想像しやすい。sCD46 は decoy としてリンパ球膜の CD46 の活性化を阻害すれば regulatory T は産生されにくくなり自己免疫は悪化する。このようなモデルは実験的に証明が可能であろうか？我々は CD46 TG マウスを作製し、外から抗体を投与して CD46 を刺激し続ける動物モデルを作製した。この系で自己免疫疾患と補体の関係を再考したい。最近の知見は従来の「補体=免疫複合体クリアランス」説に補体=regulatory T 誘導説を付加することを許容するように見えるが evidence は今後の研究結果に委ねられる。

References

1. Waxman FJ, et.al., J Clin Invest. 74(4):1329-40.

- (1984)
2. Kemper C, et.al., Nature. 23;421(6921):388-92.(2003)
3. Marie JC, et.al., Nat Immunol. 3(7):659-66.(2002)
4. Kurita-Taniguchi M, et.al., J Immunol. 1;165(9):5143-52.(2000)
5. Hirano A, et.al., J Biochem (Tokyo). 132(1):83-91.(2002)
6. Kawano M, et.al., Clin Exp Immunol. Jun;116(3):542-6.(1999)

ループス腎炎と補体

関根英治

福島県立医科大学 医学部 第二内科、米国 サウスカロライナ医科大学

Lupus Nephritis and Complement

Hideharu Sekine

Department of Internal Medicine II, Fukushima Medical University

Medical University of South Carolina

自己免疫性疾患である全身性エリテマトーデス (SLE)では、免疫複合体性腎炎いわゆるループス腎炎が生命予後要因として臨床上問題となる。ループス腎炎では、腎糸球体にIgG (免疫複合体)及びC3の沈着がしばしば観察され、腎炎の活動性とIgG・C3の沈着の程度がよく相関する。このことから、腎への免疫複合体沈着に惹起された局所での補体経路の活性化が、ループス腎炎の主要な要因とされ、補体による腎基底膜の破壊が蛋白尿の成因の一つと考えられてきた。今回我々は、2つのモデルマウスを作製し、ループス腎炎における補体の役割及び蛋白尿の成因について検討した。

<C3 ノックアウト MRL/lpr マウス>

MRL/lpr マウスは SLE の動物モデルとしてしばしば SLE の病態解析に用いられている。我々は、C3 ノックアウト(KO) MRL/lpr マウスを作成し、ループス腎炎での C3 の役割について検討した。その結果、wild type MRL/lpr マウス群と比較し、C3 KO MRL/lpr マウス群では、腎の病理組織像および生命予後の改善は認められず、蛋白尿 (尿中アルブミン量) はむしろ悪化する傾向が認められた。さらに C3 KO MRL/lpr マウス群では、対照群と比較して有意に腎への免疫複合体の沈着が多く、これは C3 による免疫複合体のクリアランス活性の欠損が原因と推測された¹⁾。

<IgG3 欠損 MRL/lpr マウス>

最近、我々は MHC (H-2) が SLE の病態に及ぼす影響を調べるため、H-2 が wild type MRL/lpr マ

ウス(H-2^b)と異なる H-2^b congenic MRL/lpr マウスを作製したところ、約 70%の H-2^b MRL/lpr マウスで選択的に IgG3 が欠損する現象を発見した。この IgG3 欠損 H-2^b MRL/lpr マウス群は、IgG3 発現 H-2^b MRL/lpr マウス群及び、H-2^k wild type MRL/lpr マウス群と比較して、腎への C3 沈着レベルに差が認められないにも関わらず解析した 10 匹中全てのマウスで尿蛋白 (尿中アルブミン量) が高度に低下していた。電子顕微鏡にて腎組織を検討したところ、メサングウム領域及び、血管内皮細胞下への免疫複合体の沈着の程度に 3 群間で差が認められなかったが、IgG3 欠損 H-2^b MRL/lpr マウス群では、他の 2 群と比較して 10 匹中全てのマウスで上皮細胞下に免疫複合体の沈着が全く認められず、また、ネフローゼ症候群でしばしば認められる上皮細胞融合の程度も軽度であった。

<まとめ>

我々は、2つのモデルマウスを用いてループス腎炎における補体の役割及び蛋白尿の成因について検討した。ループス腎炎において補体経路の活性化は有害な面が強調されてきたが、C3 は免疫複合体のクリアランスにおいて、有益な役割も演じていることが示唆された。また、ループス腎炎に伴う蛋白尿の成因について、補体による腎基底膜の破壊が主な原因と考えられてきたが、IgG3 免疫複合体による新たな一面も示された。

<文献>

1) Sekine H. et al., J. Immunol. 166 : 6444 (2001)

膠原病と補体 — 補体制御による膠原病の治療戦略

松尾清一、森田良樹、志水英明、丸山彰一、¹水野正司

名古屋大学大学院病態内科学、¹ウエールズ大学医学部生化学

Complement and collagen disease – Strategies for the treatment of collagen disease.

Seiichi Matsuo, Yoshiki Morita, Hideaki Shimizu, Shoichi Maruyama, ¹Masashi Mizuno

Department of Medicine, Graduate School of Medicine, Nagoya University

¹Department of Biochemistry, University of Wales College of Medicine

〈はじめに〉膠原病には様々な疾患が含まれ、その病態も多様である。膠原病の病態には補体の関与が少なからず指摘されているが、治療に関しては副腎皮質ステロイド、免疫抑制薬、免疫調節薬、非ステロイド系抗炎症薬、などが主に使われており、補体を標的にした治療法は存在していないのが現状である。すべてを網羅できないが、補体システムの制御による膠原病治療の可能性につき他のグループの仕事の紹介も含めて、発表する。

〈研究の方法〉モデル動物：抗原抗体反応により補体が重要な役割を果たす疾患モデルとして、ラット Thy-1 腎炎モデル、抗糸球体基底膜抗体腎炎、抗内皮細胞抗体による腎炎、コラーゲン関節炎、ループスマウスモデル、などがある。これらに以下の抗補体薬またはヒトループスでは C1q 固着カラムを用いてその効果が調べられている。①C1q と特異的に結合してその作用を抑制するペプチドなど、②最も有効かつ有望なものとして可溶性ヒト補体レセプター 1 (sCR1)、③C5a と拮抗的にレセプターへの結合能を有するペプチドや抗アナフィラトキシン抗体など、④補体成分 C1q を固着したカラムを用いる方法、である。

〈報告されている結果〉sCR1 は C3 のレベルで補体の活性化を強力に抑制し、C3 以後の様々な補体活性化産物による障害をブロックする。sCR1 またはその類似物質は様々な動物疾患モデルに投

与され、ほぼ例外なく著明な効果があるとされている^{1) 2)}。C1q 結合ペプチドは *in vitro* においてその有効性が報告されている³⁾。また、血栓を形成するような抗体と補体依存性の腎炎にはアナフィラトキシンの抑制が有効と見られる^{4) 5)}。

〈考察〉ヒトループス患者の皮膚病変に対して C1q 吸着が行われ有効であったとの報告もあり⁶⁾、SLE に対する C1q 固着カラムは有望な治療法である可能性がある。sCR1 はヒト以外ではその有効性が広く知られており、ヒト疾患に対する臨床試験が協力を推進されるべき物質であると考えられる。また全身的かつ長期の補体抑制の副作用が懸念されるので、局所への遺伝子導入など治療の方法論についても今後研究が必要である⁷⁾。

〈結論〉補体をターゲットにした治療法の開発はいくつかのヒト疾患の克服のため重要である。

〈文献〉 1) Mizuno M. et al., *Arthritis Rheumat.* 44:2425 (2001)

2) Bao L. et al., *J. Am. Soc. Nephrol.* 14:670 (2003)

3) Roos A. et al., *J. Immunol.* 167:7052 (2001)

4) Kondo C. et al., *Clin. Exp. Immunol.* 124:323 (2001)

5) Ikeguchi H. et al., *Kidney Int.* 61:490 (2002)

6) Pfueller B. et al., *Arthritis Rheumat.* 44:1962 (2001)

7) Shimizu H. et al., *J. Am. Soc. Nephrol.* in press.

L-ficolin/P35 のアポトーシス細胞へ結合による補体レクチン経路の活性化

蔵屋幹夫¹、Zhenping Ming²、Xianzhou Liu³、松下操⁴、藤田禎三¹

¹福島県立医科大学生化学第二講座、²武漢医科大学寄生虫学講座、³武漢医科大学微生物講座、⁴東海大学工学部生命化学科

L-ficolin/P35 binding to apoptotic cells leads to complement activation via the lectin pathway.

Mikio Kuraya¹, Zhenping Ming², Xianzhou Liu³, Misao Matsushita⁴, and Teizo Fujita¹

¹Dept. of Biochemistry, Fukushima Medical University School of Medicine, ²Dept. of Medical Parasitology, Research Laboratory of Schistosomiasis Medical College of Wuhan University, ³Dept. of Microbiology, Medical College of Wuhan, ⁴Institute of Glycotechnology and Dept. of Applied Biochemistry, Tokai University.

(はじめに)

補体レクチン経路が自然免疫の重要な一翼を担うことが明らかとなって来ている。我々は、一昨年、グリオーマ細胞株がレクチン経路成分を産生することを報告した。今回は、この局所産生の生理学意義として、自己由来の標的であるアポトーシス細胞の除去への寄与を考慮した。これまで、MBLやC1qがアポトーシス細胞に結合することが報告されていることから(1、2)、Ficolinも同様の機能を持つことが期待される。検討の結果、補体レクチン経路レクチン L-ficolin/P35 がアポトーシス細胞に直接、結合すること、続いて、補体の活性化が生じることを見出したので報告する。

(方法)

- 1) アポトーシス細胞の調製：標的細胞として、U937、HL60、Jurkat 細胞を用いて、Actinomycin D により、アポトーシスを誘導した。アポトーシス細胞の有無は DNA の断片化により確認した(Quick Apoptotic DNA Ladder Detection Kit, BioVision Inc.)。
- 2) 標的細胞へのレクチンおよび C4、C3 の結合：標的細胞をヒト血清(正常、C1q-depleted, MBL-depleted L-ficolin-depleted) 或いは精製成分と 37°C でインキュベートし、洗浄後、レクチン、C4、C3 に特異的な抗体(anti-MBL:3E7, anti-L-ficolin/P35:2F5, anti-H-ficolin/Hakata antigen:4H5, anti-C4: polyclonal antibodies, anti-C3: C3G)、更に蛍光標識 2 次抗体と反応させた後、フローサイトメトリーにより解析した (FACS Calibur 4A)。

(結果)

- 1) U937, HL60, Jurkat 細胞を Actinomycin D 処理し、アポトーシスを誘導した後、正常血清と 37°C でインキュベートすると、MBL および L-ficolin/P35 の apoptotic HL60、

apoptotic U937、apoptotic Jurkat 細胞への結合が認められた。さらに続いてレクチン経路の活性化に基づく C4、C3 の固着も認められた(図 1)。H-ficolin/Hakata antigen は apoptotic Jurkat 細胞においてのみ観察された。

- 3) 精製レクチン経路成分 MBL、L-ficolin/P35、H-ficolin/Hakata antigen のアポトーシス細胞への結合。正常ヒト血清を用いて観察された同様のレクチンの結合が、精製レクチンにおいても観察され、他の分子を介さず、直接結合することが判明した(図 2)。
- 4) 精製 L-ficolin/P35 をアポトーシス細胞に結合させた後、精製 C4 分子と反応させると、C4 の固着、即ち、アポトーシス細胞上での活性化が観測された。
- 5) L-ficolin/P35-depleted serum を用いて、アポトーシス細胞上の、L-ficolin/P35 経由の補体活性化の程度を検討すると、正常血清による C3 活性化の 67.7% に減少した。
- 6) L-ficolin/P35 および C3 は細胞のアポトーシス細胞に特異的に結合する。

(考察)

L-ficolin/P35 はアポトーシス細胞に他の分子を介さず、直接結合し、更に、L-ficolin/P35 に会合した MASP-2 によって C4 が切断され、補体の活性化、即ち、レクチン経路の活性化が生じることが判明した。この活性化はアポトーシスを起こした細胞に特異的であった。これまで、報告されている MBL や C1q と同様の機能を有すると考えられる。また、これらの分子と比較すると、認識する糖鎖 GlcNAc から考慮して、アポトーシスの過程で生じる GlcNAc 付加反応を認識するものであると考えられる。更に、H-ficolin/Hakata antigen については、糖鎖認識の相違があると推測される。

A 1

(文献)

- 1) Ogden, C.A., A. de Cathelineau, P.R. Hoffmann, D. Bratton, B. Ghebrehiwet, V.A. Fadok, and P.M. Henson. *J. Exp. Med.* 194:781 (2001)
- 2) Bajtay, Z., M. Jozsi, Z. Banki, S. Thiel, N. Thielens, and A. Erdei. *Eur. J. Immunol.* 30:1706 (2000).

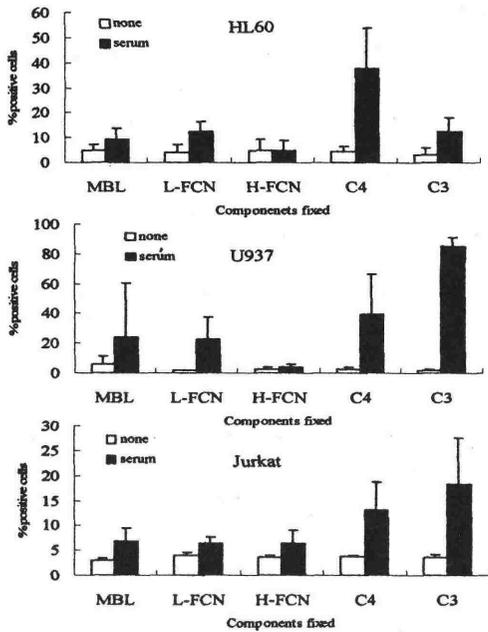


図1: 血清レクチン・補体の結合

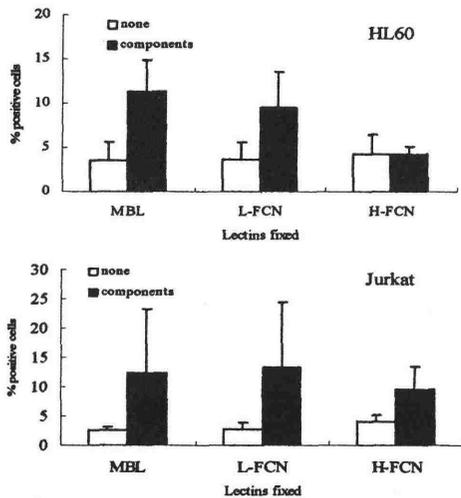


図2: 精製レクチンの結合

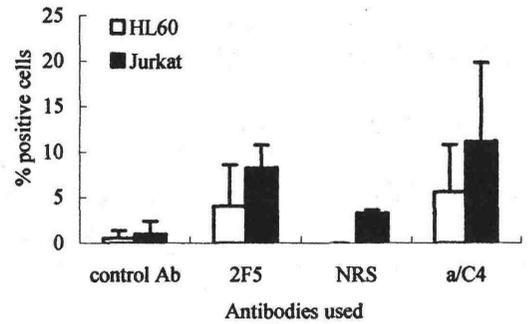


図3: 精製 L-ficolin/P35-MASPs による C4 の活性化 (2F5: anti-L-ficolin)

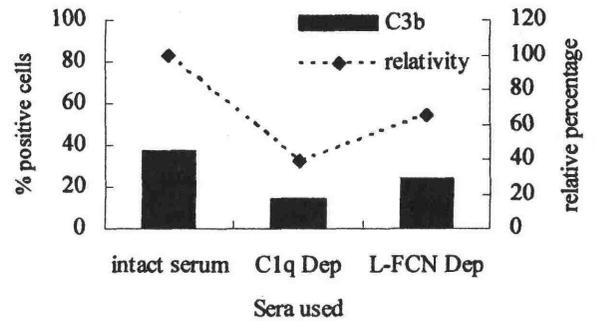


図4: アポトーシス細胞上での C3 の活性化

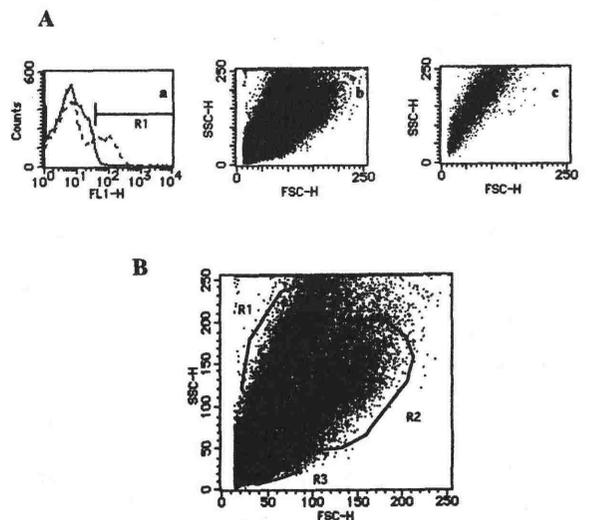


図5: L-ficolin/P35 のアポトーシス細胞への結合

MBLと種々のIgAおよび免疫グロブリンとの結合性

寺井 格¹、小林 邦彦²、J-P Vaerman³、真船 直樹⁴

¹北海道医療大学医療科学センター、²北海道大学小児科、

³Dept. Exp. Med. Univ. Louvain、⁴酪農学園大学酪農学部

Binding ability of Mannose binding lectin (MBL) with various IgAs and immunoglobulins

Itaru Terai¹, Kunihiko Kobayashi², J-P Vaerman³, Naoki Mafune⁴

¹Insti. Med. Sci., Health Sciences Univ. Hokkaido, ²Dept. Pediat., Hokkaido Univ. School of Medicine,

³Dept. Exp. Med. Univ. Louvain, ⁴Laboratory of Medical Dietetics,
Department of Food Science, Faculty of Dairy Science, Rakunougakuen Univ.

<はじめに>

MBLが血清IgAと結合しレクチン経路を活性化することが、最近、報告された⁽¹⁾。IgA腎症の中にはMBLが組織に沈着しているものがあることも既に報告されており^(2,3)、MBLおよびレクチン経路のIgA腎症への関与が推測される。IgA腎症で検出されるIgAはIgA 1が優位と言われている。IgA 1では、その糖鎖からガラクトースのはずれたものが本症の原因とする意見があり⁽⁴⁾、MBLと同時に腎に沈着していたのはIgA 1だったと報告⁽⁵⁾されているが、IgA 2だったとの報告⁽⁶⁾もある。我々は種々のミエローマのIgA 1ならびにIgA 2、各種免疫グロブリンとのMBLの結合性を検討した。

<方法>

IgGは正常ヒト血清から、sIgAはヒト初乳より、その他の種々のIgAおよび免疫グロブリンはミエローマ患者血清から定法に従い調整した。種々のIgAならびに各種免疫グロブリンをマイクロプレートに固相化し、牛血清アルブミンでブロックした。固相へのMBLの結合はビオチン化した精製MBLを段階希釈して各ウェルに添加するか、あるいは精製したMBLないし血清を段階希釈して各ウェルに添加し、更に抗MBL抗体を添加することで検出した。免疫グロブリンからのガラクトースの除去は固相上でノイラミニダーゼとβ-Dガラクトシダーゼを37度で作用させることにより行った。免疫グロブリンへの酸処理(pH2, 37度, 1時間)も固相上で行い、MBLへの結合性の変化を検討した。

<結果>

MBLは、ある特殊なIgA (IgA2m(2) dimerの一つ)と強く結合し、その結合はマンノース、Nアセチルグルコサミンなどの糖、あるいはEDTAにより阻害された。他の免疫グロブリンはMBLとは結合し

ないか、あるいは結合性が劣るが、それらはノイラミニダーゼとβ-Dガラクトシダーゼの酵素処理により、量依存的に、かつ経時的にMBLとの結合性を増すようになった。また、酸処理により結合性を増すようになる免疫グロブリンが分泌型IgAを始めとしていくつか認められた。MBLの野生型(A/A)、変異型ヘテロ(A/B)とのIgAとの結合性はこの順に低くなり、ホモ(B/B)では全く結合が見られなかった。

<考察>

これらの結果より、(1) MBLはどんなIgAとでも結合できるわけではないこと、(2) その結合は糖鎖を介したものであること、(3) 結合性がない、あるいは弱い免疫グロブリンも、酵素処理によりシアル酸とガラクトースを除去すると、あるいは酸処理により立体構造が変化すると、マンノースやNアセチルグルコサミンなどの糖鎖が露出することにより、MBLとの結合性を増すようになることが考えられた。

以上より、MBLの関与するIgA腎症では特定の糖鎖が露出した特殊なIgAがその発症に関与している可能性が示唆された。またその際、MBLの変異型ホモ(B/B)は発症に関与せず、遺伝子変異を有するヒトでは本症の発生率が低くなることが推測された。

<文献>

- (1) Roos A et al., J Immunol., 167: 2861 (2001)
- (2) Endo M et al., Nephrol. Dial. Transplant., 13: 1984 (1998)
- (3) Matsuda M et al., Nephron, 80: 408 (1998)
- (4) Mestecky J et al., Contrib. Nephrol., 104: 172 (1993)
- (5) Hisano S, Am. J. Kid. Dis., 38: 1082 (2001)

Expression of Ficolin A and Ficolin B in Adult Mouse and Developing Embryo

Yu Liu¹, Yuichi Endo¹, Shunsaku Homma², Kazuko Kanno¹,
Hiroyuki Yaginuma², Teizo Fujita¹

¹Department of Biochemistry and ²Department of Anatomy,
Fukushima Medical University

<Background>

Ficolins are a group of proteins with lectin activity, which plays a role in host defense by binding to carbohydrates on microorganisms, enhancing the opsonic activity of neutrophils and activating the lectin pathway¹⁾. They have been identified in various species, including human, rodents, pig, mouse, hedgehog, and also ascidians. Mouse ficolins are clarified into two types, termed ficolin A and ficolin B. Previous study showed that liver and spleen are the main organs that express mRNA of ficolin A by Northern blot²⁾. The objectives of present research are to confirm the cellular origin of ficolins in adult mouse and to explore the ontogeny of ficolins in developing embryos.

<Methods>

In situ hybridization was carried out on the cryostat sections of mouse embryos from E9.5 to E18.5, livers from neonatal mice of day 1, 5, 10 and 28, and various tissues from adult mice, including liver, spleen, heart, lung, brain, and kidney. The digoxigenin- or biotin-labeled riboprobes was used to detect ficolin A and ficolin B mRNA in the sections. Immunohistochemical reaction was also carried out on continuous sections, using anti-CD68 antibody for identifying macrophage cells.

<Results>

In adult mouse, ficolin A mRNA mainly localizes in Kupffer cells in liver and macrophage cells in spleen, whereas ficolin B does not express

in any tissues at detectable level. Interestingly, both ficolin A and ficolin B were expressed in livers of embryos from E12.5 to E18.5 and of newborns. Expression of ficolin A in embryo's liver is stronger and wider than that of ficolin B. Expression of ficolin B in embryo's liver continues increasing with days until day E18.5, with a post-natal decline.

<Conclusion>

Mouse ficolin A and ficolin B are expressed in monocyte-macrophage lineage. The different spatial-temporal expression patterns of ficolin A and ficolin B suggest their different roles in pre- and post-natal stages.

<Reference>

- 1) Fujita T., Nat. Rev. Immunol.,
2:346(2002)
- 2) Fujimori Y. et al., Biochem.
Biophys. Res. Commun.,
244 :796(1998)

ヤツメウナギ MBL のタンパク精製と構造の決定

高橋百恵¹、松下操²、松下亜紀子¹、遠藤雄一¹、藤田禎三¹

¹福島県立医科大学 医学部 生化学第二講座

²東海大学 工学部 生命化学科

Characterization of lamprey lectin similar to mammalian mannose-binding lectin (MBL)

Momoe Takahashi¹, Misao Matsushita², Akiko Matsushita¹, Yuichi Endo¹, Teizo Fujita¹

¹Department of Biochemistry, Fukushima Medical University.

²Department of Applied Biochemistry and Institute of Glycobiology, Tokai University.

<はじめに>

哺乳類では MBL やフィコリンなどのレクチンが、微生物上の糖鎖を認識して補体レクチン経路を活性化する¹⁾。無脊椎動物のホヤでは、GBL (glucose-binding lectin) と呼ばれるレクチンが見つかっており、糖を認識する CRD 様構造を持っているが、他の MBL とは異なりコラーゲン様構造は持っていない²⁾。脊椎動物の最下等である円口類のヤツメウナギには、獲得免疫は存在せず、生体防御は自然免疫が中心とされているが、その実体は明らかにされていない。

そこで本研究では、ヤツメウナギにコラーゲン様構造を持った MBL に相当するレクチンが存在するか否かを検討した。

<実験方法>

ヤツメウナギの血清を GlcNAc-agarose カラムと MonoQ カラムを用いて精製した。このレクチンについて、MBL のようにコラーゲン様構造を持っているのか、セリンプロテアーゼと複合体を形成しているかなどを調べた。さらに一次構造を明らかにするために、気相シーケンサーによって、コラゲナーゼ、V8 酵素で切断した断片のアミノ酸配列を決定した。部分アミノ酸配列から合成 DNA プライマーを作成して RT-PCR を実施した。得られた cDNA 断片をもとに全長 cDNA 及びアミノ酸配列の決定を試みた。

<結果>

このレクチンは SDS-PAGE の結果より、還元下で分子量が 25 kDa のタンパク質であることがわかった (以下 L25K と省略)。

MCA 活性の結果より、L25K にはプロテアーゼ活性を持つ酵素が結合していることが明らかとなった。ヤツメウナギの MASP-A 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った結果、L25K には MASP-A が会合していることが明らかになった。コラゲナーゼ処理により分子量が小さくなることからコラーゲン様構造を持つことが推測された。決定したアミノ酸配列からも Gly-X-Y の繰り返し構造を確認することができた。L25K について相同タンパクの検索を行ったところ、ヒト、マウス、ラットなどの MBL と高い相同性を示した。

<考察>

ヤツメウナギには MBL が存在する。この L25K にはヒトの MBL などと同様にセリンプロテアーゼが会合していることから、レクチン経路の活性に関与していると唆される。

<文献>

- 1) Fujita T., Nature Rev. Immunol. 2: 346: (2002)
- 2) Kenjo A, et al., J. Biol. Chem. 276: 19959 (2001)

インテレクトインファミリーに属するヤツメウナギ血清レクチン

松下亜紀子、遠藤雄一、中田宗宏¹⁾²⁾、松下 操¹⁾²⁾、藤田禎三
 福島県立医大・医・二生化,¹⁾ 東海大・工・生命化学,²⁾ 糖鎖工学研究施設

Novel lamprey serum lectin belonging to the intelectin family

Akiko Matsushita, Yuichi Endo, Munehiro Nakata,

Misao Matsushita and Teizo Fujita

Department of Biochemistry, Fukushima Medical University School of Medicine

¹⁾ Department of Applied Biochemistry and ²⁾ Institute of Glycotechnology, Tokai University

〈はじめに〉

インテレクトインはホヤからヒトまで広く存在し、その構造はよく保存されながら発現部位や糖への結合性に多様性が見られる動物レクチンである。ホヤに見出された同ファミリーである galactose-specific lectin はオプソニンとして機能する¹⁾。また、ヒト腸管に発現するインテレクトイン(HL-1) は *in vivo* で細菌の細胞壁成分を認識することが報告されている²⁾³⁾。今回我々はヤツメウナギ血清から mannan 結合性の新規インテレクトイン(intelectin A)を単離した。

〈方法〉

1) mannan-agarose カラムを用いて、ヤツメウナギ血清より intelectin A を精製した。
 2) intelectin A の部分アミノ酸配列をもとに作製したプライマーを用いて肝臓 cDNA を鋳型として PCR を行い、全一次構造を決定した。
 3)intelectin A の部分 PCR 産物をプローブに、ヤツメウナギ鰓・肝臓・腸管・血液細胞・心筋から抽出した total RNA を用いて Northern blotting を行った。

〈結果〉

1) intelectin A はいずれもインテレクトインのホモログである 41,35,32kDa の3種類のサブユニットから成るヘテロポリマーであった。

2) 各サブユニットの構成比から9量体を形成していると予想された。

3) 41,35,32kDa の各サブユニットはそれぞれ 377,333,327aa から成り、32kDa は 41kDa の splicing variant であった。相同性は 41kDa-35kDa が 64.5%、41kDa と 35kDa のヒトインテレクトイン HL-1 との相同性はそれぞれ 54.8%、57.3%であった。

4) Northern blotting の結果、各サブユニットとも肝臓に特異的に発現が見られた。

〈考察〉

生体における局在性の多様さに特徴があるインテレクトインファミリーの機能については不明な点が多い。mannan 結合性を有するインテレクトインがヤツメウナギ血清に存在することは、インテレクトインが下等動物では重要な血清成分として生体防御の役割を担っていると考えられる。

参考文献

- 1)Abe, Y. et al (1999) Eur. J. Biochem. 261, 33-39.
- 2)Tsuji, S. et al (2001) J. Biol. Chem. 276, 23456-23463.
- 3)Lee J-K. et al (2001) Glycobiology 11,65-73.

PIG-W is critical for inositol acylation but not for flipping of glycosylphosphatidylinositol-anchor

Uamporn Siripanyaphinyo, Yoshiko Murakami, Ji Young Kang, Sonoko Ishihara¹, Hideki Nakakuma¹, Yusuke Maeda and Taroh Kinoshita

Department of Immunoregulation, Research Institute for Microbial Diseases,
Osaka University, ¹The Second Department of Medicine, Kumamoto University School of Medicine,

Objective

Many cell surface proteins, including complement regulatory proteins such as decay accelerating factor (DAF or CD55) and CD 59, are attached to the membrane via glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor. GPI anchors are synthesized prior to transfer to the C-termini of proteins by sequential additions of glycan components to phosphatidylinositol¹⁾. In mammalian cells, inositol ring of phosphatidylinositol is acylated at the third step in GPI biosynthesis (Fig.1). The purpose of this study is to identify the responsible gene and the role of inositol acylation.

Methods

Using human T lymphoma Molt 4 cell line which is defective in inositol acylation, we have cloned a responsible gene, termed *PIG-W*, by expression cloning and have analyzed the encoded protein.

Results

1. Molt4 1D10 and CHOPA 10.14 (derived from CHO cell) mutant cells are defective in the surface expression of GPI anchored proteins.

2. We analyzed the accumulated GPI intermediate lipids in these cells by metabolic labeling with mannose. They were defective in inositol acylation, which is not essential for the subsequent

mannosylation. But we did not find GPI having phosphoethanolamine (P-Etn) on the third mannose.

3. The responsible gene, *PIG W*, encodes a 504 amino acid protein containing multiple transmembrane domains, which is localized in the endoplasmic reticulum (ER).

4. The tagged *PIG-W* affinity-purified from transfected human cell had inositol transferase activity in cell free system.

Conclusion

These results suggest that inositol acylation is critical for the surface expression of GPI anchored proteins and that *PIG-W* is likely inositol acyltransferase itself. Inositol acylation is not essential for flipping GPI from cytoplasmic side to the luminal side of the ER but may be critical for the addition of the bridging P-EtN to the third mannose.

Reference

- 1) Kinoshita T. et al., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4: 632 (2000)

DAF による NK 細胞依存性細胞傷害の抑制について

久保朋子^{1,2)}、宮川周士¹⁾、日馬多美子¹⁾、福田大輔¹⁾、松浪勝義^{1,2)}、白倉良太¹⁾¹⁾大阪大学大学院医学系研究科・組織再生医学講座・臓器置換、²⁾日本動物工学研究所(AERI)

Decay accelerating factor (DAF: CD55) function on natural killer cell-mediated cytotoxicity

Tomoko Kubo^{1,2)}, Shuji Miyagawa¹⁾, Tamiko Kusama¹⁾, Daisuke Fukuta¹⁾, Katsuyoshi Matsunami^{1,2)}
and Ryota Shirakura¹⁾¹⁾Division of Organ Transplantation, Department of Regenerative Medicine,Osaka University Graduate School of Medicine, ²⁾Animal Engineering Research Institute (AERI)

<はじめに>

補体制御因子 DAF (CD55) は 4 つの機能ドメイン ; short consensus repeat (SCRs) を持ち、C3 変換酵素である C3bBb, C4b2a を解離失活させ補体制御機能を示す。この DAF の補体制御機能は SCR2-3 が classical pathway に、SCR2-4 が alternative pathway に関与すると報告されている¹⁾。

一方、1992 年 Finberg らにより、DAF が NK 細胞による細胞傷害機能を抑制する事が報告され²⁾、また昨年 Caragine らにより Crry に同じく NK 細胞を抑制する機能があることが報告された³⁾。

今回我々は、DAF のもつ NK 細胞依存性細胞傷害抑制機能 (NK 細胞制御機能) が、補体制御機能とどのように関与しているかを検討した。更に、DAF 以外の補体制御因子についても NK 細胞制御機能の有無を検討した^{4,5)}。

<方法>

Wild-type DAF および SCR の一カ所を欠損させた

delta-SCR1~4 DAF 株を遺伝子構築し、発現ベクターである pCXN (beta actin promoter) に導入した。

次に各遺伝子をブタ血管内皮細胞 (SEC)⁶⁾ に遺伝子導入後、その発現量を FACS により同定し、各安定細胞株を作成した。DAF 以外の補体制御因子として、N 末よりの SCR1-4 を膜型にした factor H (膜型 factor H)、同じく膜型にした C1-INH (膜型 C1-INH) およびコントロールとして CD59 も同様にブタ血管内皮に遺伝子導入後、その発現量を同定し、細胞株を作成した。

NK 細胞による SEC 傷害機能を検討するために、エフェクター細胞として NK-like cell line である YT cell を用い、ターゲット細胞である SEC に対して 5 : 1, 10 : 1 の割合で 37°C、4 時間反応させた後、ターゲット細胞から遊離される L-リン酸デヒドロゲナーゼ (LDH) を測定した。

また、補体制御機能は SEC に 20 % および 40 % の正常ヒト血清 (NHS) を 37°C、2 時間反応させた後、LDH を測定し、算出した。

<結果>

- 1) DAF の補体制御機能は delta-SCR2 DAF および delta-SCR3 DAF で失われていた。
- 2) DAF の NK 細胞制御機能は delta-SCR2, 3 および 4 DAF で失われていた。
- 3) DAF 以外の補体制御分子である膜型 factor H、膜型 C1-INH、および CD59 は、すべて補体制御機能は示したが、NK 細胞制御機能は示さなかった。

<考察>

各 SCR 欠損株、delta-SCR1~4 DAF、の結果から、DAF の NK 細胞制御機能には SCR2, 3 および 4 が関与していることが判明した。また、補体制御機能は delta-SCR2, 3 DAF で欠損し、delta-SCR4 DAF で保存されていた事より、DAF の NK 細胞制御機能と補体制御機能を比較する上で、SCR4 が重要であると考えられた。

一方、このブターヒトの系は classical pathway が主に動くことを報告している⁶⁾。DAF の SCR2, 3 および 4 は alternative pathway の制御に関与しているため、次に alternative pathway における解離活性をもつ補体制御因子である factor H を調べた。膜型 factor H で NK 細胞傷害抑制機能が示されなかった事より、DAF の NK 細胞制御機能は、alternative pathway の補体抑制能には依存せずに、作用していると考えられた。

更に、我々はこの SEC を使った系で、C1-INH が C3, C4 の膜上への沈着の両方を約 50% 抑制することを報告している。そこで、この NK 細胞制御機能と NK 細胞の補体レセプターとの関与を C1-INH により検討してみたが、NK 細胞による傷害機能への影響はほとんど示されなかった。

<結論>

DAF のもつ NK 細胞依存性細胞傷害を抑制する機能は、補体制御機能とは別に作用している事が示唆された。

<文献>

1. Brodbeck WG, Kuttner-Kondo L, Mold C, Medof ME, Immunology, 101:104-111(2000)
2. Finberg RW, White W, Nicholson-Weller A. J Immunol, 149:2055-2060(1992)
3. Caragine TA, Imai M, Frey AB, Tomlinson S., Blood, 100:3304-3310(2002)
4. Yoshitatsu M, Miyagawa S, Mikata S, et al. Biochem Biophys Res Commun, 265: 556-562, (1999)
5. Fukuta D, Miyagawa S, Yamada M, et al. Xenotranplantation, 10:132-41(2003)
6. Miyagawa S, Shirakura R, Nakata S, et al. Transplantation, 58:834-840 (1994)

ヒト肺組織と非小細胞肺癌における新しい DAF variants

大須賀文彦¹⁾、遠藤雄一²⁾、樋口光徳¹⁾、管野隆三¹⁾、寺島雅典¹⁾、藤田禎三²⁾、後藤満一¹⁾¹⁾福島県立医科大学第一外科学講座, ²⁾福島県立医科大学第二生化学講座

Novel DAF variants in human lung and non-small cell lung cancers

Fumihiko Osuka¹⁾, Yuichi Endo²⁾, Mitsunori Higuchi¹⁾, Ryuzo Kanno¹⁾, Masanori Terashima¹⁾, Teizo Fujita²⁾ and Mityukazu Goto¹⁾¹⁾Department of Surgery I and ²⁾Department of Biochemistry,
Fukushima Medical University School of Medicine

〈はじめに〉

Decay-accelerating factor (DAF, CD55)は、補体活性調節に関与するタンパク質群の一つである。直腸結腸癌のような腫瘍環境において、DAF の発現は増強すると報告されている¹⁾。直腸結腸癌で高発現される生理学的意義は未だ不明であるが、自己補体の攻撃から腫瘍細胞を防御する意味があると推測されている。ヒト DAF では二つのイソフォームが報告されている²⁾:一つは glycosylphosphatidylinositol (GPI)アンカー型膜タンパクであり、もう一つは alternative splicing により同じ遺伝子から産生される可溶性タンパクである。今回、我々はヒト肺組織において三種類の新たな DAF splicing variant を見出し、その生理学的役割と非小細胞肺癌における発現を明らかにするために基礎的検討をおこなった。

〈方法〉

- 1) DAF variant の cDNA は、ヒト肺組織の cDNA を鋳型として RT-PCR をおこない、PCR 産物の塩基配列を決定して同定した。
- 2) DAF variant の発現組織は RT-PCR とノザンブロットにより検討した。
- 3) DAF variant タンパクの細胞での存在部位は、構築 cDNA を CHO 細胞に遺伝子導入し、発現された DAF タンパクをウエスタンブロットと免疫染色法で検討した。また、培養液中に分泌された可溶性 DAF は ELISA によって検出した。

ットと免疫染色法で検討した。また、培養液中に分泌された可溶性 DAF は ELISA によって検出した。

- 4) 非小細胞肺癌と正常肺組織での DAF variant の発現は RT-PCR および ELISA を用いて検討した。

〈結果〉

- 1) ヒト肺組織より DAF variant 2, 3, 4 と名づけた三種類の新しい DAF のイソフォーム cDNA を単離した。新しいイソフォームはヒト DAF 遺伝子の第 9 エクソンと第 11 エクソンとの間に存在する三つの新しいエクソンを含む splicing variant であった。
- 2) アミノ酸配列の親水性プロットから推測される DAF variant タンパクは GPI アンカー型ではなく、全て可溶性タンパクと考えられた。
- 3) 三種類の DAF variant の mRNA は肺、肝、脾、末梢白血球などほとんどの組織に発現していた。
- 4) CHO 細胞に発現させた DAF variant をウエスタンブロットで調べた結果、全ての DAF variant がアミノ酸配列から算出される分子量 (41-43 kDa) をもっていた。また、ELISA によって培養液中に DAF タンパクが検出された。培養液を免疫沈降させウエスタンブロットに

より検討した結果、各 DAF variant は 55-60 kDa のタンパクとして検出された。

5) 免疫染色において、DAF variant タンパクは CHO 細胞の細胞質に認められた。

〈まとめ〉

- 1) ヒトの肺組織から三種類の DAF variant cDNA を分離した。これらは、それぞれ新たなエクソン配列を含む同一遺伝子からの splicing variant であった。
- 2) これらの cDNA は、可溶性 DAF をコードしており、糖鎖の付加後ただちに細胞外に分泌されると考えられた。
- 2) DAF variant の生理的役割および腫瘍における動態については現在検討中である。

参考文献

- 1) Koretz K, Bruderlein S, Henne C, Moller P. Decay-accelerating factor (DAF, CD55) in normal colorectal mucosa, adenomas and carcinomas. 1992. *Br J Cancer* 66: 810-814.
- 2) Caras IW, Davitz MA, Rhee L, Weddell G, Martin Jr DW, Nussentweig V. Cloning of decay-accelerating factor suggests novel use of splicing to generate two proteins. 1989. *Nature* 325:545-549.

Peanut Agglutinin(PNA)認識糖蛋白としての Decay-Accelerating Factor(DAF)の同定と非小細胞肺癌における発現

樋口光徳¹⁾、遠藤雄一²⁾、鈴木弘行¹⁾、大須賀文彦¹⁾、塩 豊¹⁾、藤生浩一¹⁾、
管野隆三¹⁾、寺島雅典¹⁾、藤田禎三²⁾、後藤満一¹⁾
福島県立医大・医・¹⁾第1外科, ²⁾第2生化

Identification of Decay-Accelerating factor(DAF) as a Peanut Agglutinin(PNA) binding molecule in human lung and alternative splicing and glycosylation of DAF in non-small cell lung cancer(NSCLC).

Mitsunori Higuchi¹⁾, Yuichi Endo²⁾, Hiroyuki Suzuki¹⁾, Fumihiko Osuka¹⁾, Yutaka Shio¹⁾,
Koichi Fujiu¹⁾, Ryuzo Kanno¹⁾, Masanori Terashima¹⁾, Teizo Fujita²⁾, and Mitsukazu Gotoh¹⁾

¹⁾Department of Surgery I and ²⁾Department of Biochemistry,
Fukushima Medical University School of Medicine

〈はじめに〉

Decay-Accelerating Factor(DAF,CD55)は補体制御蛋白としていくつかの癌細胞での発現異常が報告されている^{1,2)}。今回我々はヒト肺組織において、植物レクチンである Peanut Agglutinin(PNA)の認識糖蛋白の1つが DAF であることを見出した。PNA は腫瘍関連抗原である galactose β 1-3-N-acetylgalactosamine を認識する³⁾。非小細胞肺癌(NSCLC)における DAF の関与を明らかにするために、腫瘍組織における DAF 遺伝子の転写と翻訳後の糖鎖の付加について正常組織と比較検討した。

〈方法〉

1)ヒト肺組織からマイクロソーム分画を調整し、PNA 結合糖蛋白を検出するために PNA を用いたレクチンブロットを施行した。
2)PNA-セファロースカラムを用いて、ヒト肺組織マイクロソーム分画をから PNA 結合糖蛋白を精製し、この試料を抗 DAF 抗体を用いたウェスタンブロットで解析した。また、肺組織のマイクロソーム分画を抗 DAF 抗体で免疫沈降させ、得られた試料を PNA レクチンブロットで解析した。

3) NSCLC 腫瘍組織と同一試料内の正常組織における DAF 蛋白の発現は、ウェスタンブロットおよび組織染色により調べた。また、mRNA を組織から抽出し RT-PCR を行い DAF の発現レベルを比較した。

4)RT-PCR により得られた産物の塩基配列を決定し、Intron7 を含む DAF variant の全長 cDNA を構築した。

〈結果〉

1) 約 60 kDa の PNA 結合糖蛋白がヒト肺組織のマイクロソーム画分に見出された。PIPLC およびO-グリカナーゼ処理の結果から、この蛋白はO型糖鎖をもつ GPI アンカー型膜蛋白であることがわかった。

2) アフィニティクロマトグラフィにより得られた試料の PNAレクチンブロットおよび免疫沈降により得られた試料の PNA レクチンブロットの結果から、60 kDa の PNA 結合糖蛋白は DAF であることが明らかになった。

3) レクチンブロットおよびウェスタンブロットの結果から、NSCLC 組織における DAF 発現量は同一組織の正常部分と比較し有意に

低下していることがわかった。また NSCLC 組織では正常組織に比べ、高分子量の DAF (約 70 kDa) の発現を認め、この高分子量 DAF は PNA との結合性を示さなかった。

3) PCR 産物の塩基配列の決定により、Intron 7 を含む二種類の variant の存在が明らかになった。一つは Intron 7 の配列の全長を含み、二つ目は Intron 7 の前半部分を含んでいた。Intron 7 の配列は exon 7 と類似した配列の繰り返しからなっており⁴⁾、serine, threonine および proline(STP)に富むアミノ酸をコードしていた。これらの variant の発現は NSCLC 組織において増加を認めた。

〈まとめ〉

ヒト肺組織にみられる 60 kDa PNA 結合糖蛋白が DAF であることを明らかにした。NSCLC においては、DAF は高分子に移行し、PNA との反応性がない分子に変化していた。また、NSCLC 組織では O 型糖鎖の結合できる STP 領域が長い splicing variant が増加しており、高分子量 DAF の産生に寄与していると考えられた。このように、NSCLC 組織では DAF 遺伝子の転写や翻訳後の糖鎖付加に変化が生じていることが明らかになった。この変化が、NSCLC の腫瘍化あるいは転移にどのように関与するかについて現在検討を進めている。

参考文献

- 1) Koretz K, et al. Br J Cancer 66: 810-814, 1992.
- 2) Nakagawa M, et al. J Gastroenterol Hepatol. 16:184-189, 2001.
- 3) Donald RH et al. Cancer 47:2872-2877, 1981.
- 4) Nonaka M, et al. J immunol 155:3037-3048, 1995.

ニワトリの RCA (regulator of complement activation) 遺伝子産物の構造・機能解析

信田京子、押海裕之、石井一夫、松本美佐子、瀬谷司、
大阪府立成人病センター研究所 免疫学部門

Structure and function of chicken RCA gene family proteins

Kyoto Shida, Hiroyuki Oshiumi, Kazuo Ishii, Misako Matsumoto, Tsukasa Seya

Department of Immunology, Osaka Medical Center for Cancer and Cardiovascular Diseases

〈はじめに〉

ヒト、マウスには相同の RCA gene cluster がある。(マウスでは一部転座が認められる)我々はニワトリから補体制御因子 cremp を MCP アナログとしてクローニングし、microchromosome に cremp の遺伝子座を固定した。Cremp を含む~200kb の BAC clone を4個とり、この解析からトリにも RCA gene cluster が存在することを証明した。さらに RCA には cremp 以外にも少なくとも4個の SCR を含む遺伝子が同定できることを昨年報告した。今回、このうち2個の完全長 cDNA をクローニングし、構造、機能解析を行ったので報告する。

〈方法〉

BAC sequencing : ABI PRISM 310 Genetic Analyzer を用いて塩基配列の決定をおこなった。Southern blottin: 制限酵素処理した BAC clone をアガロースゲルで分離し、DNA をニトロセルロース膜に転写した。DIG 標識したプローブをハイブリさせて検出をおこなった。Homology search : ヒトの補体制御因子との相同性は、GENETYX-MAC プログラムにより

解析した。

〈結果、考察〉

ニワトリの RCA は~100kb に少なくとも5つの SCR 蛋白の遺伝子群を含む。RCA のマーカー遺伝子 PFKFB2 もこの中に同定する。ヒトの約 1/10 のスケールであり、これを全てシーケンスすることを計画中である。今回はエクソントラップで同定した2つの SCR 蛋白と cremp のエクソン、イントロン構造、一次構造からの蛋白構造予測、スプライス産物の同定を行った。機能については査定中である。

3種の SCR 蛋白の構造を予測した。Cremp は MCP (CD46) に類似するにも拘らず Ser/Thr-rich region を欠き、Cremp が膜蛋白であるのに対し、新規の蛋白の1つは SCR10 個からなる可溶性蛋白であった。Complement regulatory soluble protein-1 (CRES-1) と名付けた。もう1つは SCR 7個に GP1 anchor が付加したタンパク質であった。Complement regulatory GPI—anchored protein(CREG-1) と名付けた。CRES-1は SCR1 が slit exon で CR1 の SCR23 と43%の、C4bp の SCR23 と38%

のアミノ酸相同性があった。さらに SCR3, SCR4 が C4bp の SCR3, SCR4 とそれぞれの 50%、43% 相同性であることから、C4bp の活性中心を含むと推定された。C4bp で SCR1 は活性に殆ど影響しないが、CRES-1 の SCR1 も splice out された isoform が発現していた。CRES-1 はヒト C4bp のプロトタイプと云える。

一方、CREG-1 は SCR1-4 が CR1 の SCR1-4 と 40% 台の相同性を有していた。マウス Crry の活性中心とも高い相同性を持っていた。GPI アンカーは DAF に似るので CR1/Crry と DAF のハイブリッドと想定された。これらは mRNA レベルでユビキタスな発現が見られ、補体から自己細胞を守る機能を有するものと想定された。

機能についてはリコンビナントから明らかにする予定である。

〈文献〉

Inoue N, Fukui A, Nomura M, Matsumoto M, Nishizawa Y, Toyoshima K, Seya T. A novel chicken membrane-associated complement regulatory protein: molecular cloning and functional characterization. *J Immunol.* 2001 Jan 1;166(1):424-31.

尾索動物カタユレイボヤゲノムからの補体系遺伝子探索

吉崎 史子¹、Isidore Rigoutsos²、野中 勝¹¹東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻、²IBM Thomas J. Watson Research CenterComplement Genes in the *Ciona* GenomeFumiko Yoshizaki¹, Isidore Rigoutsos², Masaru Nonaka¹¹Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, University of Tokyo,²IBM Thomas J. Watson Research Center

[はじめに]

ホヤの属する尾索動物亜門は、脊椎動物亜門、頭索動物亜門とともに脊索動物門を構成し、脊椎動物の免疫系の進化を考える際に重要な位置にある。獲得免疫を備えていないと考えられ、補体系は生体防御で中心的な役割を担っていると期待される。現在までにホヤからは C3, Bf, MASP などが単離されており¹、複数成分で構成される補体系の存在が示唆されているが、MBP や後期成分の報告はなく、全貌は明らかになっていない。本研究では、ドラフトゲノム配列が公表されたカタユレイボヤ(*Ciona intestinalis*)²で、補体系遺伝子の網羅的探索を行った。

[方法]

現在までに報告のある補体系遺伝子のうち、系統発生的にカタユレイボヤに近い種のものを選択し、アミノ酸配列をプローブにしてカタユレイボヤドラフトゲノム配列³に対して tBlastn プログラムで相同性検索を行った。ゲノムプロジェクトでの遺伝子予測と相同性検索の結果、EST の配列の情報をあわせて遺伝子モデルを修正し、アミノ酸配列を予測した。SMART プログラムでドメイン構造の予測を行った。分子系統樹は、ClustalX によるアライメントに基づき、近隣結合法で作製した。

[結果]

カタユレイボヤゲノムには、哺乳類に匹敵する数の補体系遺伝子がコードされていた。また、今までに尾索動物では見つかっていなかった C1q 様遺伝子、後期

成分様遺伝子も同定された。

ドメイン構造の解析から、C1q、MBP、ficolin、MASP、C3 は脊椎動物とほぼ共通のドメイン構造だった一方、Bf は N 末側に SCR、LDLR、SCR の 3 ドメインを余分に持ち、後期成分様分子は TSP、TSP、LDLR、MAC/PF、EGF-like という構成で脊椎動物の C6 に似ていたものの、C 末側の SCR、FIM ドメインを欠いていた。

分子系統樹による解析からいずれの分子もカタユレイボヤ単独あるいはマボヤの分子と共に単系統のクラスターをつくり、これらの遺伝子族は尾索動物、脊椎動物の分岐後に、それぞれの系統で独立の遺伝子重複によりメンバーを増やしたことが示唆された。

[考察]

ゲノム配列の探索により、カタユレイボヤには哺乳類の補体系活性化経路の遺伝子のホモログが予想以上に多数存在することが明らかになり、獲得免疫非存在下でホヤの補体系が重要な役割を果たすことが示唆された。また、後期成分様分子が多数あり、MAC/パーフォリンドメインによる膜破壊複合体形成反応が脊椎動物の共通祖先ですでに存在したことが示唆された。それぞれの要素の存在は明らかになったので、補体系として連動して働かざるかどうかの解明が今後の課題である。

[文献]

- 1) Nonaka, M. *Curr Opin Immunol* 13: 69 (2001)
- 2) Dehal, P. et al., *Science*, 298: 2079 (2002)
- 3) <http://genome.jgi-psf.org/ciona4/ciona4.home.html>

ドチザメ C3/C4/C5 cDNA のクローニング

竹本忠司、寺戸勲雄、野中真弓¹、木村博、野中勝¹

滋賀医科大学、放射線基礎医学講座

¹ 東京大学大学院理学系研究科、生物科学専攻Molecular cloning of C3/C4/C5 cDNAs from dogfish *Triakis scyllia*Tadashi Takemoto, Tokio Terado, Mayumi Nonaka¹, Hiroshi Kimura, Masaru Nonaka¹

Department of Experimental Radiology, Shiga University of Medical Science, Shiga 520-2192, Japan

¹Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, University of Tokyo, Tokyo 113-0033, Japan

<はじめに>

補体系は系統発生的には、獲得免疫が有顎脊椎動物の出現初期に成立する以前から、後口動物の生体防御において重要な役割を果たしてきた。我々は補体系遺伝子の分子進化について興味を持ち、軟骨魚類であるドチザメを材料に用いて、補体関連遺伝子の解析を行ってきた。今回 C3/C4/C5 cDNA のクローニングと配列決定を行ったので、そのコピー数と遺伝子増幅時期の解析、ドメイン構造や活性部位の変遷などについて報告する。

<方法>

- 1) ドチザメ(成体)肝臓から total RNA を抽出し逆転写反応により cDNA を合成した。
- 2) thiol ester bond 領域にプライマーを設計し、degenerate PCR 法により、C3/C4/C5 分子の断片を得た。同じ分子を拾わないために工夫を重ねながら、新しい分子の探索を行った。
- 3) 得られた断片の配列を元に、5', 3'-RACE を行い、全長をクローニングした。C3A, C4A については全塩基配列を決定した。その他の分子については現在塩基配列の決定を行っている。

<結果>

- 1) 2 種の C3cDNA が得られた(C3A, C3B)。全長はいずれも約 5.0 kb で、両者の間には 70-80% のアミ

ノ酸相同性が見られた。C3A は catalytic histidine を持っていたが、C3B では histidine が arginine に変わっていた。

- 2) 3 種の C4cDNA が得られた(C4A, C4B, C4C)。全長はいずれも約 5.1 kb で、相互に 40-60% のアミノ酸相同性が見られた。C4A では catalytic histidine が見つかったが、C4B, C4C では histidine が asparatic acid と glycine に変わっていた。
- 3) 1 種の C5 様 cDNA が得られた。全長は約 5.0 kb であった。thiol ester bond 領域に他の生物の C5 同様に変異が見つかった。しかし、配列途中に translocation が見られるため、この分子が C5 分子であるかについては更に解析を行う必要がある。

<考察>

C3, C4 遺伝子は多コピー数が存在することがわかった。しかしながらその遺伝子増幅は硬骨魚類や他の脊椎動物のものとは独立に生じていることが明らかになった。また、catalytic histidine が他のアミノ酸に置換していることから、このことが多様な異物結合性を示すために重要な働きをしていることが示唆された。

<文献>

- Nakao M. et al., Eur. J. Immunol. 30: 858 (2000)
Kuroda N. et al., Immunogenet. 51: 117 (2000)

コイ補体における C3d フラグメントの生成 および C3d レセプターの検出

中尾実樹、三浦知歌子、井藤俊亮、中原マキ子、奥村啓子、矢野友紀
九州大学大学院農学研究院

Generation of a complement C3 fragment equivalent to mammalian C3d
and detection of its receptor in the common carp (*Cyprinus carpio*).

Miki Nakao, Chikako Miura, Shunsuke Itoh, Makiko Nakahara, Keiko Okumura, Tomoki Yano
Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University

<はじめに>

哺乳類では、C3 の最終分解産物である C3dg と C3d は、B リンパ球上に発現する CR2 と相互作用することによって、抗体産生応答を制御することが知られている¹⁾。このような先天性免疫と獲得免疫を繋ぐ掛け橋が、系統発生的にいつ頃確立したのかは明らかではない。硬骨魚類の C3 の活性化に伴う断片化については、C3 から C3b を経て iC3b まで分解されることは報告されているが、iC3b がさらに切断されるかどうかは不明である。そこで本研究は、ザイモサンで活性化させたコイ血清中とザイモサン表面での C3 の断片化を解析した。哺乳類の CR2 に相当する C3d レセプターがコイにも存在するかどうかについても予備的に検討した。

<方法>

1. C3 断片の検出と同定：コイ血清を 10 mg/ml zymosan と 25℃、0.5, 1, 2, 6, 12, 24, 48 時間インキュベートし、各時間毎に試料の一部をとって遠心し、ザイモサン粒子と活性化血清に分離した。これら固相および液相の C3 断片を、抗コイ C3 α 鎖ポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロッテ

ィングで解析した。

2. 組換えコイ C3d タンパクの調製：コイ C3-H1 および C3-S アイソタイプ²⁾をコードする cDNA から C3d に相当する配列を PCR 増幅し、チオエステル部位を GCGEQ から GAGEQ に変異させた後に、pGEX-4T-1 ベクターに連結した。これを大腸菌 DH5 α に導入し、発現した glutathione-S-transferase (GST)-C3d 融合タンパク質を glutathione-Sepharose カラムで精製した。

3. C3d レセプターの検出：コイ末梢血から Percoll 遠心法で分離したリンパ球を 96 穴プレートの底面に吸着させ、さらに BSA とゼラチンでブロッキングした。これに GST-C3d (または対照として GST)、抗 GST ヤギ抗体、ペルオキシダーゼ標識抗ヤギ IgG の順に反応させ、ABTS と過酸化水素による発色を 415 nm で測定した。

<結果>

1. ザイモサンとコイ血清をインキュベートすると、6 時間をピークとして、35 kDa の α 鎖由来ポリペプチドが、ザイモサン表面上および活性化血清中に検出された。N 末端アミノ酸配列から、こ

のポリペプチドは哺乳類の C3d に相当することがわかった。コイ血清中には2種の主要な C3 アイソタイプ(C3-H1 と C3-S)が存在するが、両者から C3d が生じた。ただし、その効率は C3-H1 の方が高かった。

2. C3-H1 および C3-S に由来する C3d の組換えタンパク質を GST との融合タンパク質として発現させた (GST-C3d-H1 および GST-C3d-S)。これらのコイリンパ球に対する結合を、対照である GST と比較したところ、GST-C3d-H1 と GST-C3d-S は GST よりも有為に高い結合を示した。また、結合の度合いは、GST-C3d-H1 の方が、GST-C3d-S よりも高かった。これらの結合は、EGTA や EDTA で阻害されなかったので、CR3 を介したものではないと考えられる。

<考察>

フグゲノムデータベースをサーチしても、今のところ、哺乳類の CR2 に明らかな相同性を示す配列は見つかっていない。しかしながら、本研究で認められたコイリンパ球と組換え C3d との結合は、硬骨魚類にも CR2 に相当する分子が備わっていることを示唆する。この点は、タンパク質・DNA レベルで今後検討すべき課題である。

コイの主要な C3 アイソタイプである C3-H1 と C3-S が、C3d への分解効率および C3d まで分解された後のリンパ球への結合で異なったことは、硬骨魚類における C3 の機能的多様性の新たな例である。ただし本研究では、補体のターゲットとしてザイモサンを使用したのみなので、今後、他の標的異物でも同様な違いが生じるかを検討する必要がある。

<結論>

1. コイ補体 C3 の主要なアイソタイプ C3-H1 と C3-S は、C3d にまで分解された。
2. 組換えコイ C3d は、コイリンパ球に結合性を示したことから、哺乳類の CR2 に相当する C3d レセプターが硬骨魚類にも存在するのではないかと考えられる。

<文献>

- 1) Carroll MC and Prodeus AP. *Curr Opin Immunol.* 10: 36 (1998).
- 2) Nakao M et al., *Eur. J. Immunol.* 30: 858 (2000).

発作性夜間血色素尿症(PNH)における 異常クローン拡大に関わる候補遺伝子

泉井朋久¹⁾、桑山真輝²⁾、西村純一³⁾、待井隆志¹⁾、金倉 譲²⁾、木下タロウ¹⁾、井上徳光⁵⁾

¹⁾大阪大学微生物病研究所免疫不全、²⁾大阪大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科学

³⁾デューク大学医学部血液学、⁴⁾那智勝浦町立温泉病院内科、

⁵⁾大阪府立成人病センター研究所分子遺伝学部門

A candidate gene involved in expansion of PNH cells

Tomohisa Izui¹⁾, Maki Kuwayama²⁾, Jun-ichi Nishimura³⁾,

Takashi Machii¹⁾, Yuzuru Kanakura²⁾, Taroh Kinoshita¹⁾, and Norimitsu Inoue⁵⁾.

¹⁾Department of Immunoregulation, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

²⁾Department of Hematology and Oncology, Osaka University Medical School

³⁾Division of Hematology, Department of Medicine, Duke University Medical Center

⁴⁾Division of Internal Medicine, Nachi-katsuura Onsen Hospital

⁵⁾Department of Molecular Genetics, Osaka Medical Center for Cancer and Cardiovascular Disease

【背景と目的】

発作性夜間血色素尿症(PNH)は補体制御因子であるDAFやCD59の欠損のため、自己補体による溶血発作を起こす後天性疾患である。これらの補体制御因子はグリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)と呼ばれる糖脂質を介して細胞膜に発現している。PNH患者の血球細胞においてはGPIアンカー型蛋白が全般に欠損しており、GPIの生合成に関わる遺伝子であるPIG-Aが原因遺伝子として同定されている。PNH患者ではPIG-Aの突然変異およびそれによるGPIの欠損を示す血球細胞が全系統とも骨髓・末梢血中でクローン性に優位となることが知られている。

PNHを合併する頻度が高い再生不良性貧血(AA)の患者においてはGPI欠損細胞が正常人に比して高頻度に認められることから、こうしたクローナルな拡大に自己免疫的機序が関与している¹⁾と推定されて

いる。しかし、AA患者にみられるGPI欠損細胞は微量にとどまることが多く、またPNH患者においても数的に拡大しないGPI欠損クローンを認めることから、さらなる遺伝子異常がクローンの拡大に関与していることが考えられる²⁾。

我々は、骨髓においてPIG-Aの変異を持つ細胞と染色体異常を持つ細胞が一致しており、2つの異常が同一の造血幹細胞に起こったものと考えられるPNH症例を報告してきた³⁾。今回は、本症例における候補遺伝子の質的・量的異常を中心に報告する。

【方法と結果】

1. 染色体異常の解析 この患者にみられる染色体構造異常については昨年度までに本シンポジウムにて報告した。すなわち、一方の12番染色体のq13-q15領域の9.3Mbp程度が他方の12番染色体のq15領域に挿入されているものであり、また染

色体のbreakpoint周囲に数kbp程度の欠失および一部重複がみられた。

2. 患者におけるHMGA2遺伝子の発現 挿入が起こっている部位には脂肪腫や子宮筋腫などの良性腫瘍で異常発現していることが知られている遺伝子 high-mobility group protein A2 (HMGA2)が存在しており、それが3'-UTR領域で分断されていた。HMGA2はAT-hookと呼ばれるDNA binding domainをもつ転写因子である。本来は胎児期においてのみ発現し、正常な成体組織では発現していないとされているが、ヒトの脂肪腫や子宮筋腫などの良性腫瘍細胞において染色体転座に伴うキメラ蛋白として発現していることが知られている^{4,5,6}。本症例の骨髄細胞から良性腫瘍の症例と同様に、異常なHMGA2のmRNAを検出した。異常なmRNAについてリアルタイムPCRを用いた定量解析および、それぞれのmRNAがコードする異常蛋白の機能解析を進めている。

【考察】

最近、PNH患者の血球細胞において特異的に発現の上昇がみられる遺伝子がいくつか報告されている。7例のPNH患者全例の好中球でearly growth response factor 1 (EGR-1)遺伝子の発現上昇がみられた⁷という報告に次いで、Wilms' tumor gene (WT1)遺伝子の発現上昇⁸も報告された。さらに、2003年に入ってPNH患者の好中球において四つのanti-apoptotic遺伝子の発現が上昇しているとの報告がなされた⁹。この四つのうちのひとつにras homolog gene family, member A(RhoA)があり、この遺伝子の発現によってHMGA2とEGR-1の発現が誘導される¹⁰。このことから、PNH患者の血球細胞において、RhoAを経由するpathwayにある遺伝子の発現が上昇することによってその細胞クローンの増殖が

誘導されると考えられ、本症例においてはそのpathway上のHMGA2に直接の変異が加わったことによってGPI欠損細胞のクローナルな拡大が起こったものと想像される。

【文献】

1. Murakami Y. et al., Blood, 100: 4116 (2002)
2. Inoue N. et al., Int J Hematol. 77:107 (2003)
3. Nishimura J. et al., Am J Hematol., 62: 175 (1999)
4. Schoenmakers EF. et al., Nat Genet., 10: 436 (1995)
5. Ashar H. R. et al., Cell, 82: 57 (1995)
6. Goodwin G., Int J Biochem Cell Biol., 30: 761 (1998)
7. Lyakisheva A. et al., Exp Hematol., 30: 18 (2002)
8. Shichishima T et al., Blood, 100:22 (2002)
9. Heeney MM. et al., Mol Genet Metab., 78: 291 (2003)
10. Teramoto H. et al., Oncogene, 22: 2689-97(2003)

ヒト補体成分 *C1R* 遺伝子のエクソン-イントロン構造と 遺伝子多様性の解析

中川真由美、湯浅 勲

鳥取大学医学部病態検査学講座、同医学部法医学分野

The analysis of exon-intron structure and allelic diversity of the human *C1R* gene

Mayumi Nakagawa and Isao Yuasa

Department of Pathobiological Science and Technology, Faculty of Medicine, Tottori University,

and Division of Legal Medicine, Faculty of Medicine, Tottori University

<はじめに>

ヒト補体第一成分 R 因子 (C1r) は、C1q、C1s とカルシウム依存的に結合し、古典的経路の活性化に重要な役割を果たす。現在までに 13 種の *C1R* 遺伝子が報告されており、日本人では、*C1R*1*、*C1R*2**、*C1R*5*、*C1R*8* が 0.45、0.34、0.20、0.01 の多型的頻度で出現する。*C1R* 遺伝子の詳しいエクソン-イントロン構造は明らかにされていない。本研究ではその構造と遺伝的多型の分子解析を行った。

*C1R*13* を有する日本人 5 名のサンプルについて DNA を抽出し、解析を行った。まず、すでに明らかにされている *C1S* 遺伝子の構造¹⁾をもとに、*C1R* 遺伝子の cDNA²⁾についてエクソン-イントロン境界域を推定し、イントロン増幅用のプライマーを設定し、イントロンの配列を決定した。引き続き、エクソン近傍のイントロン領域にエクソン増幅用のプライマーを設定し、解析を行った。

<結果>

<方法>

等電点電気泳動により C1r 型を決定した 63 名のランダムな日本人血液サンプルと、*C1R*8*、*C1R*9*、

1) *C1S* 遺伝子と同様に、開始コドンがエクソン 2 にあるとすると、*C1R* 遺伝子は 12 のエクソンからなり、開始コドンからエクソン 12 に位置する

停止コドンまでは11kbで *CIS* 遺伝子よりやや長く、エクソンの長さはよく類似していた。成熟タンパクの1番アミノ酸は *CIS* 遺伝子同様エクソン3にあった。

- 2) エクソン3からエクソン12までのダイレクトシーケンシングの結果、エクソン4、5、7の5箇所に変異が検出された。63名のDNAサンプルについて、表現型と、エクソン5、7に存在する3箇所の多型部位(S135L、E167K、G244R)の遺伝子型との関係を調べると、8種の考えられるハプロタイプのうち *CIR*1Ser*(S-E-G)、*CIR*1Leu*(L-E-G)、*CIR*2Ser*(S-K-G)、*CIR*5Leu*(L-E-R)、*CIR*8Ser*(S-K-R)の5種が観察され、それぞれの頻度は Hardy-Weinberg の法則に合致していた。*CIR*9* と *CIR*13* は S-K-G の配列を示し、さらに His146Tyr と Tyr114His の変異を有していた。
- 3) インترون2,3および8の7部位に SNP を検出した。また、イントロン8と11の間に散在型反復配列が、イントロン10の5'領域に CAC/T に富む繰り返し配列が存在した。

<考察>

エクソンに存在する5箇所の変異部位は、C1r タンパクを構成する5種のドメインのうち CUB1、EGF、CUB2 に集中していた。エクソンの3箇所の多型部位

に対応するマウス cDNA のアミノ酸は S-K-G で塩基も同一であるため、*CIR*2Ser* がヒト *CIR* 遺伝子の祖先遺伝子であることが示唆された。*CIR*5Leu* と *CIR*8Ser* は祖先遺伝子は異なるが、244番アミノ酸に同じ変異を有しており、*CIR*2Ser* と *CIR*5Leu* の組換えにより *CIR*8Ser* が生じたのではないかと考えられた。まれな *CIR*9* と *CIR*13* は、*CIR*2Ser* のエクソン5と4にそれぞれ点突然変異が起こり生じたと考えられた。

<結論>

CIR 遺伝子のエクソン-イントロン構造を明らかにし、対立遺伝子の多様性について解析した。今回の研究成果は、法医学や人類学のみならず、C1r 欠損症の解明などの臨床医学においても有効であると考えられる³⁾。

<文献>

- 1) Endo Y. et al., J. Immunol., 161:4924-4930 (1998)
- 2) Journet A. et al., Biochem. J., 240:783-787 (1986)
- 3) Nakagawa M. et al., Ann. Hum. Genet., 67: 207-215 (2003)

補体 C5a による摂食促進機構

大日向耕作、高木恭仁子、美谷島杏子、浅川明弘¹、乾 明夫¹、吉川正明

京都大学大学院農学研究科、¹神戸大学大学院医学系研究科

Mechanism for orexigenic activity of complement C5a

Kousaku Ohinata, Kuniko Takagi, Kyoko Biyajima, Akihiro Asakawa¹, Akio Inui¹ and Masaaki Yoshikawa

Graduate School of Agriculture, Kyoto University and

¹Graduate School of Medicine, Kobe University

<はじめに>

補体 C3a および C5a が種々の中枢作用を示すことが判明している。我々は脳室内投与の際に C3a および C5a が抗健忘作用および学習促進作用を示すことを見出してきた^{1, 2)}。一方、摂食調節に関しては C3a および C5a は促進作用を示すと報告されてきたが^{3, 4)}、我々は C3a はむしろ摂食抑制作用を示すことを見出している⁵⁾。

最近、我々は脳室内投与の際にプロスタグランジン D₂ (PGD₂) が摂食促進作用を示すことを見出した⁶⁾。その作用は PGD₂ レセプターである DP に対する選択的なアンタゴニスト BWA868C、および DP に対するアンチセンス ODN 処置によって阻害された。その作用はまた、neuropeptide Y (NPY) の Y₁ レセプターに対するアンタゴニスト BIBO33045 により阻害されることから、PGD₂ → NPY という新しい摂食調節経路が想定される。今回、補体 C5a の摂食促進活性がこの経路を介していることを示す結果が得られた。

<結果および考察>

種々の摂食促進ペプチドに対する DP アンタゴニスト BWA868C の効果を検討したところ、補体 C5a

をマウス第3脳室内投与にした際に認められる摂食促進作用が阻害された。また、DP に対するアンチセンス ODN で処置したマウスでも C5a の摂食促進作用は認められなかった。これらの結果は補体 C5a の摂食促進作用には PGD₂ が関与することを示唆している。アゴニスト非投与の際の摂食量および体重も BWA868C、および DP に対するアンチセンス ODN 処置によって低下することから、PGD₂ または補体 C5a は通常の摂食レベルの維持に関与している可能性がある。補体 C3a の摂食抑制作用と併せて、補体成分による摂食調節作用には興味を持たれる。

<結論>

補体 C5a の摂食促進作用にはプロスタグランジン D₂ および neuropeptide Y が関与している。

<文献>

- 1) Jinsmaa Y. et al., *Life Sci.*, 67:2137 (2000)
- 2) 大日向耕作 他, *化学と生物*, 41:7 (2003)
- 3) Schupf N. et al., *J Neuroimmunol.*, 5:305 (1983)
- 4) Williams CA. et al., *J Neuroimmunol.*, 9:29 (1985)
- 5) Ohinata K. et al., *Peptides*, 23:127 (2002)
- 6) Takagi K. et al. (submitted)

アナフィラトキシン C5a の 活性阻害相補性ペプチドの解析

藤田 恵美子 Farkas Imre 岡田 秀親 岡田 則子

名古屋市立大学大学院医学研究科・生体防御学

A complementary peptide that inhibits anaphylatoxin C5a

Emiko Fujita, Imre Farkas, Hidechika Okada and Noriko Okada

Dept of Molecular Biology, Nagoya City University School of Medicine

[目的]

C5a は 74 個のアミノ酸から成る強力なアナフィラトキシンであるが、37 番目のアルギニンから 53 番目のグルタミン酸に至る 17 個のアミノ酸から成る部分 (PL37 と呼ぶ) は C5a レセプター分子の幾つかの部分と antisense peptide (AP) の関係にあり、PL37 は C5a の作用に対して強力な Agonist 作用を示す(1)。また、PL37 をリジンで 8 価の Multiple Antigen Peptide (MAP) とする手法を用いて多価ペプチド PL37-MAP にすると C5a レセプター陽性細胞に対して Apoptosis を誘導する作用を示した(2)。したがって、PL37 は C5a の重要な機能部位であると推察された。そこで、PL37 を標的ペプチドとして、我々の開発した相補性ペプチド設計プログラム(3)

である MIMETIC を用いて候補ペプチドを設計し、その内の 2 種類を合成して C5a に対する作用を解析した。

[方法]

PL37 のアミノ酸配列に対する相補性ペプチドを MIMETIC (3)を用いて設計した。設計した候補ペプチドの中で、システインを含まない 2 種類のペプチド (PepA および PepB) を合成した。PL37 および C5a に対するペプチドの結合性は Surface Plasmon Resonance (SPR)法を用いて解析した。PL37-MAP はヒト Neuroblastoma 由来の TGW 細胞に対して Apoptosis を誘導するが、その作用の際に起こる膜電位の変化を single cell パッチクランプ法を用いて解析した。ヒト末梢血から好中球を分離回収して、

D 2

C5a 刺激によって Ca^{++} mobilization を起こす系に、ペプチドを混合添加したときの変化を Argus にて解析した。LPS を微量投与したラットに 16 時間後に Crry に対する活性阻害抗体 5I2 を静脈内に投与すると 30 分以内に全例ショック死を起こすことができる(4)。このショック死モデルについて、5I2 投与の 10 分前にペプチドを静脈内に注射し、ショック死に対する予防効果を検討した。

[結果]

- 1) SPR 法による解析で、PepA は PL37 および C5a に強い結合性を示した。PepB にはその様な結合性は認められなかった。
- 2) TGW 細胞に対して 500nM の PL37-MAP で起こる膜電位変化は 10 μ M PepA で抑制が認められ、50 μ M PepA では完全に抑制された。
- 3) 好中球に対して 0.7 nM で起こる Ca^{++} mobilization は 7nM PepA で抑制が認められ 350 nM で完全に抑制された。
- 4) ラットに対するショックモデルにおいても、0.5 mg/kg の PepA 投与でショック死が防がれるラットが認められ、4mg/kg では、全てのラットが救命された。PepB ではこれらの抑制作用は全く認められなかった。

[考察]

PepA と PepB は共に MIMETIC で高スコアのペ

プチドである。MIMETIC の物理化学的指標では類似したディメンジョンを持っている。しかし、PepB には標的ペプチドに結合したり、活性を阻害する作用が全く認められなかった。今後 PepA と PepB を比較解析することにより、プログラムを改良するための情報が得られると期待される。

PepA は強力な阻害効果を示し、PL37-MAP に対して 20 倍の濃度で抑制効果が得られた。C5a に対しても分子比で 10 倍の濃度で好中球に対する C5a の Ca^{++} mobilization を抑制し、500 倍では完全抑制を示した。更に、ラット C5a の PL37 部分はヒトの PL37 のアミノ酸配列とは 60%以下の相同性であるにもかかわらず、0.5 mg/kg でもショック死を防ぐ効果を示したことは、標的アミノ酸配列が異なっても標的部位の構造類似性が高いのでラット C5a に対しても抑制作用を発揮し得たと考えられる。動物実験においてショック死を防ぐ作用を持つ PepA は C5a が要因となっていると考えられる DIC や多臓器不全などの重篤な病態等への適用が期待される。

[引用文献]

- (1) Baranyi, L. et al., J. Immunol. 157: 4591 (1996)
- (2) Farkas, I., et al. Neuroscience, 86: 903 (1998)
- (3) Campbell, W., et al. Microbiol. Immunol. 46: 211 (2002)
- (4) Mizuno, M. et al. J. Immunol. 162: 5477 (1999)

C5a 走化性リセプターに対する細菌由来のリガンド、Skp

施 磊、アージュン・シュレスタ、棚瀬純男、西野憲和*、山本哲郎
 熊本大学大学院医学薬学研究部、*九州工業大学大学院生命科学システム工学研究科

Skp, a bacteria-derived ligand of C5a chemotactic receptor

Lei Shi, Arjun Shrestha, Sumio Tanase, Norikazu Nishino, Tetsuro Yamamoto
 Faculty of Medical and Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University, and Graduate
 School of Life Science and Systems Engineering, Kyushu Institute of Technology

<はじめに>

C5a リセプターは、白血球の走化性を引き起こす最も重要なリセプターの一つである。我々は、これまで、C5a のみならず S19 リボソーム蛋白二量体が C5a リセプターのリガンドとして結合し、単球を走化させることを報告してきた。その際、大腸菌に作らせた S19 リボソーム蛋白の変異組換え体を調製する過程で、大腸菌ペリプラスムの分子シャペロンである Skp も、C5a リセプターを介して単球や多核球を走化させることを見出した。外来性蛋白が C5a リセプターのリガンドとなりうるという新しい知見なので報告する。

<方法>

1. 単球および多核球は正常ヒト末梢血から調製し、走化活性はマイクロウェルチャンバー法および形態学的極性観察法を用いて測定した。
2. 細菌由来の遊走因子は、大腸菌の超音波破壊抽出液から、通常および高速液体クロマトグラフィーを用いて精製した。精製標品のアミノ酸配列は、N 末端から 20 残基を自動分析器で解析した。
3. ウサギを感作して精製標品に対する抗体を

得て、IgG 分画を調製し、ウエスタンブロット法に用いると共に、アガロースゲルに固定化して抗体ビーズとして使用した。

4. Skp の部分ペプチドは、固層法を用いて合成し、逆相カラムで精製した。

<結果および考察>

1. 大腸菌由来の白血球遊走因子は、CM-トヨパールカラム、SP-5PW カラムおよび C4 カラムを用いて、クロマトグラフィー上で、また、SDS ポリアクリルアミド上で単一にまで精製できた。電気泳動上の分子量は約 17,000 であった。得られた N 末端部のアミノ酸配列は、大腸菌ペリプラスムの分子シャペロンである Skp のそれと同一であった。報告されている Skp の分子量 (Seventeen kilo-Dalton protein から名前が由来)²⁾ も勘案して、走化因子は Skp と同定した。
2. ウサギに作成した抗体は、ウエスタンブロット法で Skp を認識した。また、抗体ビーズは部分精製した Skp 分画の遊走活性を完全に吸収した。大腸菌抽出液を抗体ビーズで処理したところ、抽出液中の遊走活性は 1/10 近くまで減少した。したがって、Skp は抽出液中の主要な遊走因子であると考え

D 3

られた。

3. Skp は、チェッカーボード分析で走化性を示し、 10^{-9}M から 10^{-8}M に至適濃度を持って、多核球および単球を遊走させ、 10^{-6}M でモルモットの皮内において強い白血球浸潤引き起こすという C5a と類似の性格を示した。ただ、至適濃度での *in vitro* での最大白血球走化数は C5a のそれよりも少なかった。
4. 白血球を予め Skp で処理しておくこと、C5a の走化活性が抑制されたこと、また、Skp の走化活性はペプチド性の C5a リセプターアンタゴニストで競合的に抑制されたことから、白血球上の Skp に対する走化性リセプターは C5a リセプターと同定した。
5. C5a と S19 リボソーム蛋白二量体は共に 2 段階結合で C5a リセプターを活性化させる。Skp の走化活性は、S19 リボソーム蛋白二量体の第一リガンド部位の配列を持つペプチドで抑制されたので、Skp も同様の 2 段階結合をすると考えられた。そこで、Skp の部分ペプチドによる二つのリガンド部位の検索を行った。アミノ酸配列上の塩基性クラスター部位である -Lys47-Met48-Lys49-Lys50- を含むアナログペプチドは、Skp の走化性を抑制したので、この部位が一次結合部位と推定されたが、このペプチドは C5a の走化活性を抑制しなかったので最終的な結論は得られなかった。第二結合部位として S19 リボソーム蛋白のそれに類似したアミノ酸配列が 3 箇所あるが、そのうち、-Gln83-Asp84-Arg85- を含む部分ペプチドは強い走化活性を、また、-Ser58-Asp59-Arg60- を含む部分ペプチドは弱い活性を示した。一方、-Glu91-Glu92-Arg93- を含む部分ペプチドは全く活性を示さなかった。更に、前二者の走化活性は、C5a リセプターアンタゴ

ニストで抑制された。したがって、-Gln83-Asp84-Arg85- もしくは -Ser58-Asp59-Arg60- が第二リガンド部位と考えられた。

<結論>

グラム陰性菌のペリプラスムに普遍的に存在する Skp は、C5a リセプターに結合することによりヒト貪食性白血球を走化させた。外膜を漏れ出した Skp に対する白血球走化反応が、細菌感染に対する生体防御機構として機能している可能性が考えられる。

<文献>

- 1) Shrestha, A. et al.: Switch Moiety in agonist/antagonist dual effect of S19 ribosomal protein dimer on leukocyte chemotactic receptor. *Am. J. Pathol.* 162:1381-1388, 2003
- 2) Holck, A., Kleppe, K.: Cloning and sequencing of the gene for the DNA-binding 17K protein of *Escherichia coli*. *Gene* 67: 117-124, 1988

麻疹ウイルス株による樹状細胞の応答性の差異

— CD46 依存性の株のみが interferon-inducible genes を発現誘導する —

谷口光恵、田辺真佐子、Nasim Ara Begum、新開大史、松本美佐子、瀬谷司

大阪府立成人病センター研究所免疫学部門

Difference in response of human dendritic cells infected by measles virus

— Expression of interferon-inducible genes by CD46-adapted measles virus in human dendritic cells —

Mitsue Taniguchi, Masako Tanabe, Nasim Ara Begum, Masashi Shingai, Misako Matsumoto, Tsukasa Seya

Department of Immunology, Osaka Medical Center for Cancer and Cardiovascular Diseases

<はじめに>

CD46 は細胞膜上の補体制御因子と同定されて以来、麻疹ウイルス、ヘルペスウイルスのレセプターとして機能していることが判明している。さらに、ある種のバクテリアが CD46 をレセプターとしていたという報告が相次ぎ、CD46 が微生物レセプターとして自然免疫に何らかの役割を果たしていることが考えられる。ヒト樹状細胞 (DC) は微生物レセプターを表現し、異物侵入を認識する。微生物レセプターにはその取り込みを促進するエントリーレセプターとシグナル細胞応答を誘起するシグナルレセプターがある。麻疹ウイルス (MV) では、感染の一次応答に関与するエントリーレセプターとして CD46 と CDw150 (SLAM) が機能しているが、初期応答に関与するシグナルレセプターは不明である。本研究では、これらのレセプターと種々のウイルス株による DC の免疫応答、さらに微生物のシグナルレセプター Toll-like receptor (TLR) の関与を検討した。

<方法>

(1) 樹状細胞の調整

末梢血から単球を分離し、GM-CSF、IL-4 存在下で

培養し、human immature DCs (iDCs) を得た。

(2) タンパクの発現の確認

Immunoblotting と Flow cytometry を用いて種々のタンパクの発現を確認した。

(3) MV の感受性

MV による syncytium の形成を観察した。又、RNA を抽出して定量 PCR を行い MV の複製を測定した。

(4) サイトカインの産生

ELISA kit を用いて培養上清を測定した。

(5) DC の活性化機能

Allo-stimulatory mixed lymphocyte reaction (MLR) を用いてリンパ球の増殖を確認した。

(6) MV 感染による遺伝子の誘導

RNA を抽出して Gene Chip 解析を行った。又、誘導された遺伝子については RT-PCR で確認した。

<結果>

(1) 単球を iDCs に分化させることによって、CDw150 (SLAM) が発現し、CD46 の tail には phosphatase (SHP-1) が recruit された。

(2) iDC への分化によって MV に対する感受性が著しく上昇した。MV 感染樹状細胞 (DC) は合胞体を作るが、一般に CDw150 依存性の野生株はウイル

D 4

ス増殖による合胞体を作りやすい。一方、CD46 依存性のワクチン株はウイルス増殖が遅く合胞体を作りにくい。

(3) Toll の stimulator によって DC の maturation を誘導するが、同時に CDw150 の表現量も増加した。

一方、CD46 は変化しなかった。さらに、iDC の maturation によって MV に対する感受性も増強し、IL-12 産生も上昇した。

(4) Toll の stimulator で DC を maturation することによってリンパ球の増殖が誘導されたが、MV の先行感染によって Toll 依存性の Toll-signaling-MLR response は強く抑制された。しかし、この TLR 活性化 DC の機能抑制の profile は株間で一様ではなかった。

(5) CDw150 依存性の Masusako 株 (MS)、CD46 依存性の Nagahata 株 (NV) で樹状細胞を刺激し、両者の相違を gene chip で解析した結果、NV は感染後 4h から 24h 以内 (従ってウイルス複製が起きる前) に特定の遺伝子発現を up-regulate した。MS はこれらの遺伝子を発現増殖しなかった。

<考察>

麻疹ウイルス(MV) は宿主に免疫抑制を誘起する。その原因は不明だが抗原提示不全とリンパ球の増殖抑制が主な outcome として報告されている。CD46 依存性の株によって up-regulate される遺伝子群の中には、Type-1 interferon (IFN) によって誘導される、いわゆる IFN-inducible genes が含まれていた。CD46 依存性の MV (ワクチン株) が、DC 内で増殖しにくいのはこれらの株が IFN を誘導する為と考えられた。

一方、NV 感染 DC, MS 感染 DC は共に MLR によるリンパ球増殖を誘導しなかった。さらに DC 活性化マーカー(CD80/CD83/CD86) やサイトカイン

(IL-12 IL-23 etc) の変動にも NV, MS で差が見られなかったことから、MV による DC の免疫抑制は IFN-inducible genes によって説明しえない別の機序によるものと推論された。他のウイルス株についてもテスト中だが、こららは NV 型 (IFN 誘導性) と MS 型 (IFN 非誘導性) に大別され、NV 型は多く CD46 をレセプターに使うこと、CD46 のシグナルが DC による抗ウイルス応答を修飾することが推定しうる。CD46 の下流のシグナル系は不明だが、マクロファージで NO 産生¹⁾、B cell で IL-4 誘導²⁾、T cell で regulatory T への分化³⁾ が報告されており、これらは共通なシグナルで DC の抗原提示不全、リンパ球増殖抑制が起きると考えられる。最近、麻疹ウイルスの H protein が TLR2 のリガンドとして機能する⁴⁾ ことも報告された。

<結論>

麻疹特有の重篤な二次感染を引き起こす免疫抑制の機序を明らかとする手がかりを見出した。

<文献>

- 1) Kurita-Taniguchi M. et al., J.Immunol., 165:5143 (2000)
- 2) Imani F. et al., J.Immunol., 162:1597 (1999)
- 3) Kemper C. et al., Nature., 421:388 (2003)
- 4) Bieback K. et al., J. Virol., 76:8729 (2002)

HIV-1 感染細胞に細胞死を誘導する ヒト IgM モノクローナル抗体の解析

金原紀章 土肥名月 朝井鈴佳 尹淑萍¹ 岡田秀親 岡田則子

名古屋市立大学大学院医学研究科・生体防御学

¹Dept of Pathology, Wayne Stated University School of Medicine

Research for antigen of human IgM monoclonal antibody
which induce C mediated cytolysis to HIV-1 infected cells.

Noriaki Kinbara, Natsuki Dohi, Suzuka Asai, Shuping Yin¹, Hidechika Okada and Noriko Okada

Department of Biodefense, Nagoya City University Graduated School of Medical Science

¹Dept of Pathology, Wayne Stated University School of Medicine

[目的]

HIV 感染長期生存者においては、その血清中に HIV 感染細胞に反応する IgM 自然抗体が存在していることを見いだした¹⁾²⁾。また、これらの自然抗体のうち、特にガングリオシド GM2 に対する IgM 抗体の関与が高く、患者血清中の抗 GM2-IgM 抗体価は CD4 値と正の相関を、HIV-RNA 量とは負の相関を示した³⁾。これは IgM 抗体が感染細胞上の抗原に結合して、感染細胞に対し補体依存性の細胞障害を持つためであることを明らかにしてきた⁴⁾⁵⁾。

そこで我々は HIV 感染細胞で TC マウス (キリンビール社) を免疫し、HIV 感染細胞に特異的に反応するヒト IgM モノクローナル抗体産生細胞株 (2G9、9F11) を樹立した。9F11 抗体は強い補体活性化能を持ち、HIV 感染細胞に補体による細胞障害を誘導したが 2G9 抗体はアポトーシスを誘導するものの補体活性化能はなかった。このことはこれらの抗体が AIDS の治療の新しい薬となり得ることを示唆している。しかし、この抗体の抗原は未だ同

定されていない。そこでこれらの抗体の認識する抗原を模索するとともに、この抗原が他にどのような細胞に発現しているかを検討した。

[方法]

正常健人より末梢血リンパ球を単離し、PHA 刺激を与え、活性化した T リンパ球を作成し、それとの反応性を検討した。9F11 抗体は各 CD マーカー (CD3、CD4、CD8) との二重染色によってどの細胞種に反応するかを検討した。また HIV-1 と同様、ヒトレトロウイルスである HTLV-1 感染細胞、MT-2 と MT-4 への反応性をフローサイトメトリー法で解析した。さらに⁵¹Cr release assay により、これらの細胞において補体による細胞障害が誘導されるかを調べた。

反応性を示した細胞で SDS-PAGE、Western-blot 解析を行った。

[結果]

2G9、9F11 抗体は正常末梢血リンパ球に反応し

D 5

ないが、9F11 抗体は PHA 刺激後の活性化リンパ球に反応した。一方 2G9 抗体は活性化リンパ球にも反応しなかった。そこで 9F11 抗体が反応する細胞種を検討したところ、CD4 陽性細胞、CD8 陽性細胞ともに反応した。特に CD8 陽性細胞では 80% 以上の細胞が反応した。HTLV-1 感染細胞である MT-2、MT-4 に対しても 2G9 抗体は反応しなかったが、9F11 抗体は反応し、さらに補体による細胞障害を誘導した。

Western-blot による解析結果より、9F11 抗体の抗原は約 30 kD であると予想される。

[考察]

9F11 抗体は HIV-1 感染細胞のみならず、活性化 T リンパ球、HTLV-1 感染細胞に反応し、補体による細胞障害を誘導することより、この抗体がこれらのウイルス感染症の治療や、自己免疫疾患、遅延型アレルギー反応や同種臓器移植拒否反応等の抑制などに使用できる可能性がある。9F11 抗体の標的抗原は 30 kD の膜タンパク質と考えられるが、その同定は目下進行中である。

[引用文献]

- 1) Okada N. et al. Microbiol.Immunol., 41: 331-6 (1997)
- 2) Wu X. et al. Int.Immunol., 8: 153-8 (1996).
- 3) Wu X. et al. Microbiol.Immunol., 44: 405-10 (2000)
- 4) Okada H. et al. Int.Immunol., 10:91-5 (1998).
- 5) Wu X. et al. J.Immunol., 162: 533-9 (1999).

家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) における免疫療法

寺崎久泰、安東由喜雄¹、原岡克己、佐々木裕

熊本大学大学院医学薬学研究部消化器内科学、¹生態情報機能解析学

Immune therapy for familial amyloidotic polyneuropathy:

Soluble tetrameric Tyr78Phe transthyretin (TTR) with a cryptic epitope of TTR prevents amyloid deposits in transgenic mice expressing the human Val30Met TTR gene

Hisayasu Terazaki, Yukio Ando¹, Katsuki Haraoka, and Yutaka Sasaki

Department of Gastroenterology and Hepatology and ¹Department of Laboratory Medicine, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University

〈はじめに〉

家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) のアミロイド沈着機構に関しては、前駆蛋白である異型トランスサイレチン (ATTR) の cryptic epitope が立体構造の変化に伴い、分子表面に露出することがアミロイド形成過程に重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた^{1), 2)}。したがって、FAP 患者に異型 TTR の cryptic epitope のみを認識する抗体を惹起させることができれば、TTR の代謝動態に影響を与えずに、アミロイド沈着を阻止することが可能と考えられた。本研究においては、アミロイド形成過程で生じる cryptic epitope を可溶性状態でも露出するように設計した人工的な点変異である ATTR Y78P を作成し³⁾、これを FAP の疾患モデルマウスであるトランスジェニックマウス ATTR V30M に免疫し、組織のアミロイド沈着への影響を検討した。

〈方法〉

1) 100 ug の ATTR Y78F, ATTR

V30M、PBS をそれぞれ生後、6, 9, 18 ヶ月のトランスジェニックマウスに免疫した。

- 2) 合計 4 回免疫後、4 カ月目に、すべてのマウスを屠殺し、免疫学的、組織学的検討を行った。
- A) 免疫学的な検討：ELISA 法を用いて、ATTR V30M に対する抗体産生の有無を検討した。
- B) 組織学的な検討：コンゴ赤染色、免疫組織染色 (ヒト TTR, CD 11b/CD18, CD45R/B220, CD 5 に対する各種抗体) を行い、アミロイド、TTR 沈着の有無を調べるとともに、上記免疫細胞の、組織変化に対する関与を検討した。

〈結果〉

- 1) トランスジェニックマウスへの ATTR Y78F 投与による免疫では、PBS や ATTR V30M の投与より有意に高い ATTR V30M に対する抗体価を誘導することができた。
- 2) PBS や ATTR V30M を投与したマウス群で

D 6

は、TTR の沈着が消化管に認められた。一方、ATTR Y78P で免疫したすべてのマウス群では、著明な TTR の沈着の減少が認められた。また、すでに TTR 沈着が存在する生後 18 ヶ月のマウス群においても、TTR 沈着の軽減が認められた。

- 3) 免疫組織学的解析においては、ATTR Y78P で免疫したマウス群では、TTR が沈着していたと考えられる部位に Mac-1 陽性細胞の浸潤と多数の CD45 陽性細胞を含むリンパ節の増生を認めた。
- 4) TTR 産生臓器臓器である、肝臓や脾臓、脈絡叢には、種々の細胞浸潤は認められなかった。

(考察)

本研究から、ATTR Y78P 蛋白の免疫により、ATTR V30M を高発現しているトランスジェニックマウスに抗 ATTR V30M 抗体を惹起することができ、TTR 沈着を抑制することが明らかとなった。すでにアミロイドが沈着しているマウスにおいても、ATTR Y78P の免疫後、TTR 沈着が軽減し、抗原-抗体反応を介した免疫応答の関与が組織学的に確認された。一方、TTR を産生する細胞には、炎症細胞の浸潤や抗原-抗体反応が認められなかったことより、ATTR Y78P によって惹起された抗体は、組織沈着アミロイドに特異的な epitope を認識するものと考えられた。

(結論)

ATTR Y78P は、FAP 疾患モデルであるトランスジェニックマウス ATTR V30M の TTR 沈着を抑制することが明らかとなった。さらに、

この抗体の抗原認識領域を明らかにし、ヒト型抗体を作成することができれば、肝臓移植にかわる FAP の根治治療に発展させることができるかと期待される。

(文献)

- 1) Ando Y. Amyloid in press. (2003).
- 2) Goldsteins G. et al., Pro. Natl. Acad. Sci. USA 96: 3108 (1999).
- 3) Redondo C. et al., J. Mol. Biol., 304: 461 (2000).

補体研究会（補体シンポジウム）会則

I 総則

- (1) 本会は補体研究会（The Japanese Association for Complement Research）という。
- (2) 本会は補体研究会ならびにこれに関連する分野の進歩発展を図ることを目的とする。
- (3) 本会は前条の目的を達成するため、次に定める事業を行う。
 - 1) 年1回以上にわたる総会ならびに学術集会（補体シンポジウム）の開催。
 - 2) 内外の関連学術団体との連絡及び協力。
 - 3) その他の必要な事業

II 会員

- (4) 本会は、補体研究ならびにこれに関連する分野の学問の研究を志す人々、及びそれに賛同する賛助会員を以て組織される。
- (5) 本会に会員として入会を希望する者は、所定の申込書に必要事項を記入し、会費を添えて本会事務局に提出するものとする。
- (6) 本会の会費については細則で定める。
- (7) 会員は学術集会に於て、その実績を発表できると共に、その抄録集の配布を受ける。
- (8) 会員で故なくして2年間会費を滞納したものは退会とみなす。
- (9) 本会の名誉を著しく毀損した会員は、運営委員会の議を経て除名することが出来る。
- (10) 本会に特に功労のあった方で、細則に定める規定により推薦された方を名誉会員とする。

III 役員

- (11) 本会に次の役員をおく。

会長	1名
運営委員	若干名
監事	2名
補体シンポジウム当期および次期集会長	2名

- (12) 会長は、本会を代表し、運営委員会を召集する。会長の選出は運営委員会が行い、総会での承認を得て決定する。任期は4年とし、2期を限度とする。ただし再任後の任期は2年とする。
- (13) 運営委員は会員から選挙により選出し、任期は4年とし連続の再任は認めない。細則で定めるところの選挙規定に従って2年毎に選挙を行い、半数ずつ交代するものとする。
- (14) 監事は、運営委員経験者の中から運営委員会が選出し、総会での承認を得て決定する。
- (15) 監事は会計および選挙等を監査する。監事の任期は4年とし、連続の再任は認めない。任期中監事を辞退するものが生じた際には、所定の手続きを経て速やかに後任を補充するものとし、その際の任期は前任者の残留期間とする。
- (16) 運営委員会の構成員は運営委員、補体シンポジウム集会長（当期および次期）および会長とする。
- (17) 運営委員会は、構成員の過半数の出席を要する。
- (18) 運営委員会は、会務の審議、本会の運営に当たる。
- (19) 補体シンポジウムの集会長は、運営委員会が選出決定する。

(20) 補体シンポジウム集会長は、補体シンポジウムを主宰する。

(21) 補体シンポジウム集会長の任期は、前期補体シンポジウム開催時に始まり、主宰補体シンポジウム終了時に終る。

IV 学術集会・総会

(22) 年次集会（補体シンポジウム）を行う。時宜に応じて必要な集会を開催することが出来る。

(23) 運営委員会は、補体シンポジウム開催中または必要に応じて会長がこれを召集する。

(24) 総会は年1回、補体シンポジウム開催中に当期集会長が召集し、運営委員会決定事項の報告と必要な討議を行い、承認を求める。

V 会計

(25) 経理会計は事務局において行うほか、必要に応じてシンポジウム集会長もこれにたずさわる。

(26) 本会の経費は、会費・寄付金・その他の収入および利子をもってこれにあてる。

(27) 補体シンポジウムにおいては、出席会員から参加費を徴収することが出来る。

(28) 本会の会計年度は1月1日に始まり、12月31日に終わり、総会において会計報告を行う。

(29) 監事は会計の監査を行い、その結果を総会において報告する。

VI 会則変更

(30) 本会の会則を変更する場合は、総会出席会員の3分の2以上の賛成を必要とする。

付則

この会則は昭和60年3月1日より施行する。

平成2年8月7日 一部改訂

平成4年7月23日 一部改訂

平成5年7月21日 一部改訂

細 則

I 会費

- (1) 本会の年会費は当分の間年額5,000円とする。但し学生会員（学部学生および大学院生）は3,000円とする。学生会員は、学生証の写し等を毎年事務局へ提出し、確認を受けるものとする。賛助会員の会費は年間1口30,000円とする。

II 選挙規定

運営委員の選出は当分の間次の規定に従って行う。

- (2) 運営委員の定数は6名を原則とする。
- (3) 選挙事務は事務局において行う。
- (4) 運営委員の選挙にあたり、運営委員候補者名簿を作成する。
- (5) 運営委員候補者として、任期満了の運営委員は3名、運営委員経験者は1名を推薦することが出来る。
- (6) 事務局は、運営委員候補者名簿および投票用紙を、会員に総会開催2ヶ月前までに郵送し、会員はそれにもとづき、所定の日時まで3名連記で投票を行う。ただし、候補者以外のものに投票しても差し支えない。
- (7) 開票には、少なくとも監事1名の立会いを必要とする。監事は、開票結果にもとづいて、得票数の上位3名の運営委員と次点1名を定め、運営委員会および総会に報告する。
- (8) 次点者は運営委員に欠損が生じた場合に、その任に当たる。

III 事務局

- (9) 本会の事務局は会長の指名する事務局長のもとに置く。

IV 名誉会員

- (10) 名誉会員の候補者の推薦は、運営委員2名以上の推薦によって成立する。名誉会員候補者は運営委員会において選考され、総会の承認を得て名誉会員に決定される。

付則

細則(1)は昭和62年度より、賛助会員については平成5年度より施行する。

平成2年8月7日 一部改訂

平成4年7月23日 一部改訂

平成5年7月21日 一部改訂

謝 辞

下記の諸社から、第40回補体シンポジウムへご支援を頂きました。
心から御礼申し上げます。

第40回補体シンポジウム
集会長 山本 哲郎

(株) 旭化成

(株) 小野薬品工業

(財) 化学及血清療法研究所

(株) 三 共

(株) 大正富山医薬品

(株) 三菱ウェルファーマ

(五十音順)

補体研究会賛助会員
(50音順)

トーアエイヨー (株)

日本ハム (株)

明治製菓 (株)

和光純薬工業 (株)

補体研究会

会 長	藤田禎三
運営委員	岡田則子
	北村 肇
	木下タロウ
	堀内孝彦
	松尾清一
	松下 操
	松本美佐子
	山本哲郎
監 事	天野哲基
	大井洋之
事務局長	
集会長	山本哲郎

