

第43回補体シンポジウム参加案内

講演会場 九州大学医学部百年講堂大ホール

受付 第1日 8月18日(金) 12時00分より

九州大学医学部百年講堂ロビーにて

参加費 一般 5,000円

学生 2,000円

懇親会費 一般 3,000円

発表方法 全て口頭発表、PCプレゼンテーションで行います。

一般演題は討論も含めて15分を予定しています。PC発表は、CD-RまたはUSBメモリーによるデータの持ち込み、もしくは各自のノートパソコンを持ち込んでの発表に限らせていただきます(CD-RWおよびDVDによるデータの持ち込みはできないのでご注意ください)。

また、発表データはWindows / Power Pointに限らせていただきます。ファイルの受付は発表30分前までにお済ませ下さい。詳細は下記の要領をご確認ください。

【発表要領】

1. CD-RまたはUSBメモリでのデータ持ち込みの場合

- 1) 事務局にて用意するPCはWindows XP、プレゼンソフトはPower Pointです。
- 2) メディアを持ち込みの場合は、Windows版Power Point2000以降で作成されたデータのみといたします。ファイル名は「演題番号+氏名.ppt」で保存してください。
- 3) MachintoshのデータはWindows上での位置のずれや文字化けなどの不具合が生じることが多いため、そのままのデータの持込みは不可とさせていただきます。各自、Windows上での動作確認と、Windows用にデータ変換を行った上でのご用意をお願いします。
- 4) 動画(ムービーファイル)がある場合には、各自のPCを持ち込んでの発表をお願いします。
- 5) Machintoshでのご発表を希望される場合は、各自のPCを持ち込んでの発表をお願いします。

6) 液晶プロジェクターの出力解像度は、SGA(1024×768)に対応しております。

7) 音声出力は使用できませんのでご了承ください。

2. PC持ち込みの場合

1) 液晶プロジェクターとの接続は、PC本体にミニD-sub15ピン外部出力コネクタが使えるものに限り、薄型PCでは特殊なコネクタ形状になっているものもありますので、必ず付属の変換アダプターを確認の上、ご用意をお願いします。

2) Power Pointにて作成したデータのファイル名は「演題番号+氏名.ppt」で保存してください。

3) データを保存する前に必ずウイルスチェックを行ってください。

4) ご発表いただく30分前までにPC受付にて、演題受付および動作確認をしてください。(できるだけ受付予定時間よりも早めをお願いします)

運営委員会 第1日 8月18日(金) 12:00~12:45(会議室)

総 会 第2日 8月19日(土) 13:00~13:30(大ホール)

懇 親 会 第1日 8月18日(金) 18:30~20:00(中ホール1)

年 会 費 会員の方で年会費を未納の方、および新たに入会される方は年会費受付にてご納入下さい。

年会費 一般 5,000円、学生 3,000円

【補体研究会事務局】

〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1

東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻

進化多様性生物学研究室内 野中 勝

Tel/Fax: 03-5841-4990

E-mail: hotai@biol.s.u-tokyo.ac.jp

<http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/meneki/hotai/>

交通アクセス

■福岡空港から

タクシー:約15分 バス:空港バスで博多駅へ

地下鉄 : 姪浜・唐津方面行き乗車

→中洲川端駅で貝塚方面行き乗り換え

→馬出九大病院前下車 約15分

■JR博多駅から

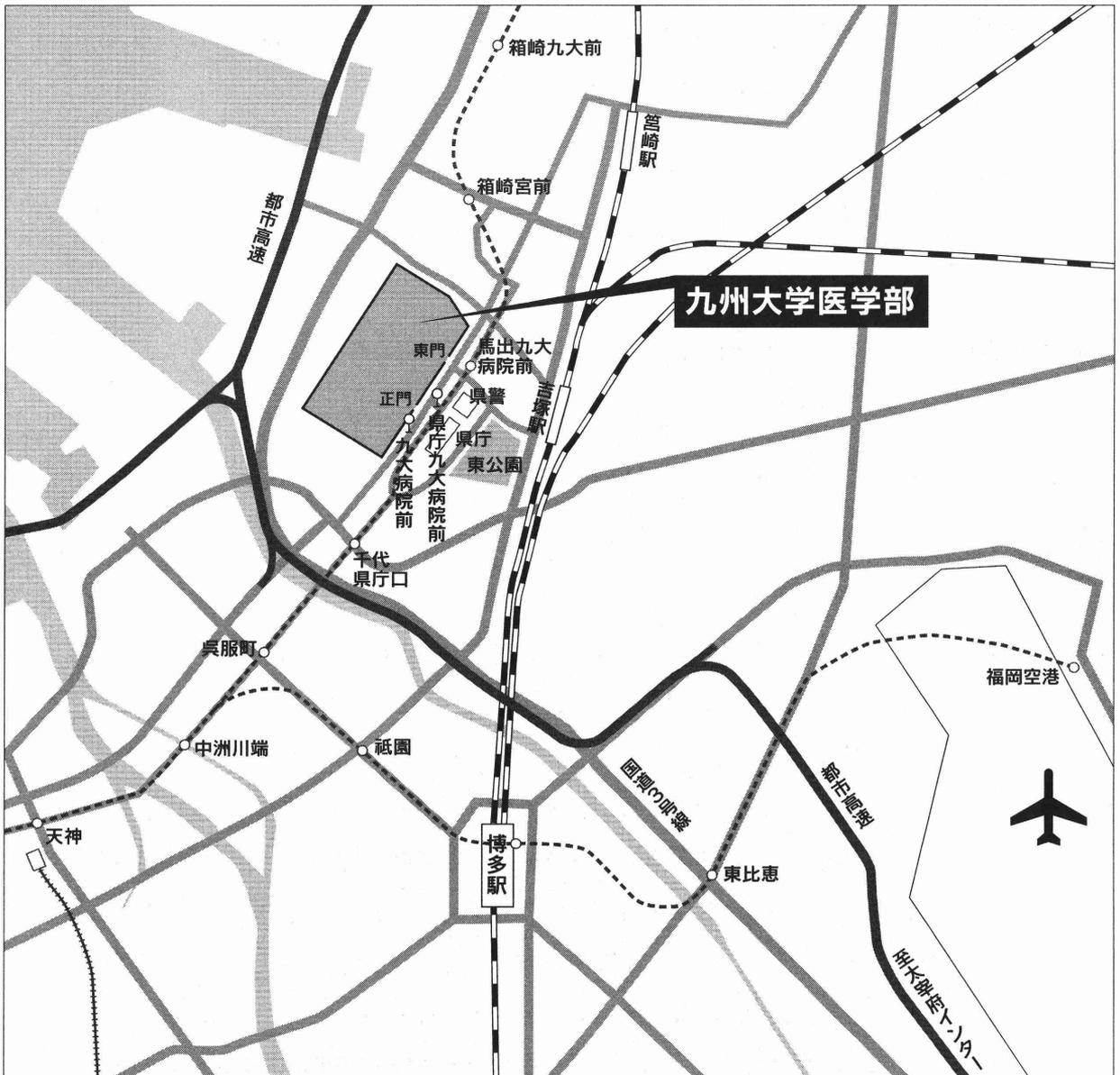
タクシー:約10分 地下鉄:「福岡空港から」と同じ 約10分

バス : 九大または県庁方面行き乗車、県庁前下車 約7分

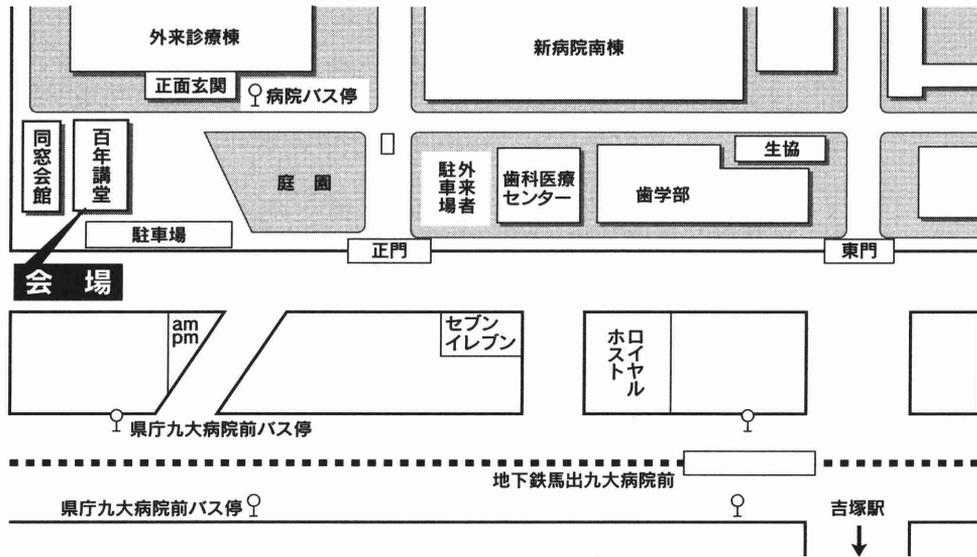
: 九大病院行き乗車、終点下車 約7分

■JR吉塚駅から

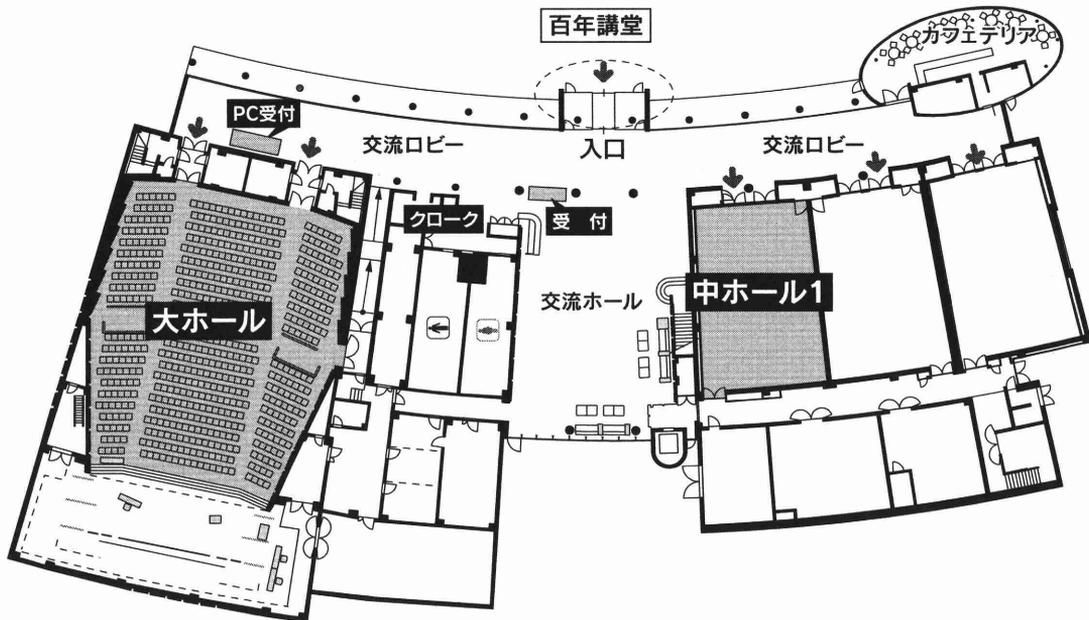
タクシー:約3分 徒歩:約15分



会場周辺のご案内



会場内のご案内



第43回 補体シンポジウム・学術プログラム

第1日 8月18日(金)

セッションA: 臨床補体1

13:00~14:00

座長 酒井 好古、末松 栄一

A-1 血液透析患者におけるmannose-binding lectin (MBL) 欠損の割合とその意義

恩田 紀更¹、大井 洋之¹、若林 道郎¹、玉野 まり子¹、大澤 勲¹、若林 正則²、富野 康日己¹

¹順天堂大学医学部腎臓内科、²望星第一クリニック

A-2 炎症性皮膚疾患でのC5aR及びC5L2発現の検討

佐藤 典子¹、阿部 正義²、竹下 重盛³、今山 修平⁴、中山 樹一郎¹

¹福岡大学医学部皮膚科学、²同薬理学、³同病理学、⁴九州医療センター皮膚科

A-3 SLE患者における感染症とMBL欠損症の関連の検討

内野 愛弓、塚本 浩、堀内 孝彦、三苫 弘喜、宮城 友豪、民本 泰浩、木本 泰孝、
宮川 弘、原田 実根

九州大学大学院病態修復内科学分野(第一内科)

A-4 抗TNF- α 製剤の補体依存性および抗体依存性細胞障害効果の検討

三苫 弘喜、堀内 孝彦、民本 泰浩、木本 泰孝、内野 愛弓、塚本 浩、原田 実根

九州大学大学院病態修復内科学分野(第一内科)

セッションB: 臨床補体2

14:00~14:45

座長 西向 弘明、福森 泰雄

B-1 全身性エリテマトーデス疾患感受性遺伝子としての補体遺伝子C3

宮川 弘¹、山井 美沙²、坂口 大志²、塚本 浩¹、古郷 功³、上田 章⁴、吉澤 誠司⁵、田平 知子²、
原田 実根¹、林 健志²、堀内 孝彦¹

¹九州大学大学院病態修復内科学分野(第一内科)、²九州大学生体医学防御研究所遺伝情報、

³北九州市立医療センター内科、⁴県立宮崎病院内科、⁵宗像医師会病院内科

B-2 加齢黄斑変性の霊長類モデルの研究

岩田 岳¹、吉田 統彦¹、梅田 慎介¹、溝田 淳²、鈴木 通弘³、寺尾 恵治⁴、吉川 泰弘⁵、三宅 養三¹

¹独立行政法人国立病院機構東京医療センター臨床研究センター(感覚器センター)、

²順天堂大学医学部浦安病院眼科、³社団法人予防衛生協会、⁴独立行政法人医薬
基盤研究所霊長類医科学研究センター、⁵東京大学大学院農学生命科学研究科

B-3 臨床検査における補体成分 C3, C4 測定値と基準範囲の標準化

池田 勝義、小島 俊哉、早原 千恵、芹川 理恵子、藤井 久美子、大田 俊行
産業医科大学 臨床検査・輸血部

抗補体薬シンポジウム

14:45~16:50

座長 南学 正臣、塚本 浩

S-1 MBL 補充療法

松下 操
東海大学・工学部・生命化学科

S-2 抗補体薬をめぐる最近の話題 — sCR1 を中心に

松尾 清一、水野 正司
名古屋大学大学院 腎臓内科

S-3 C1-インヒビター

森勢 裕
ZLB ベーリング株式会社 製品開発部

S-4 C5a アナフィラトキシン阻害ペプチドに関する研究

岡田 則子¹、朝井 鈴佳¹、堀田 彩¹、三浦 典子²、大野 尚仁²、Imre Farkas¹、Lewis Hau¹、
藤田 恵美子¹、岡田 秀親^{3,4}
¹名古屋市立大学大学院医学研究科生体防御学、²東京薬科大学薬学部免疫学、
³(株)蛋白質科学研究所、⁴福祉村病院長寿医学研究所

S-5 経口投与可能な非ペプチド性低分子の強力な C5a 受容体拮抗薬

— その創製と関節リウマチ治療薬としての可能性 —

住近 浩、阪田 圭、最上 享、石渕 正剛、中村 光治、千葉 健治
三菱ウェルファーマ(株) 創薬研究本部 創薬第三研究所

特別講演 1

17:00~18:00

座長 木下 タロウ

Clinical development update on eculizumab, an anti-C5 terminal complement inhibiting humanized monoclonal antibody

Paul W. Finnegan

Alexion Pharmaceuticals, Inc., Cheshire, CT, USA

第2日 8月19日(土)

セッションC: 進化、レクチン経路

9:30~10:45

座長 松下 操、中尾 実樹

C-1 コイ補体C1qA,B,C鎖のcDNAのクローニング

杉本 智軌、Vo Kha Tam、加藤 陽子、中尾 実樹

九州大学大学院農学研究院

C-2 二胚葉刺胞動物ネマトステラ (*Nematostella vectensis*) の原始補体系

木村 鮎子、坂口 絵里、野中 勝

東京大学大学院理学系研究科・生物科学専攻

C-3 *Staphylococcus aureus* のオプソニン化におけるMASPの役割

岩城 大輔¹、菅野 和子¹、高橋 実¹、遠藤 雄一¹、松下 操²、藤田 禎三¹

¹福島県立医大・医・免疫、CREST、²東海大学・工・生命化学

C-4 MBL-associated serine protease (MASP)-1はMASP-2の活性化を促進する

高橋 実、岩城 大輔、遠藤 雄一、藤田 禎三

福島県立医大・医・免疫

C-5 血清型フィコリンは補体レクチン経路を介して生体防御に働く

遠藤 雄一¹、中澤 なおみ¹、菅野 和子¹、Yu Liu¹、岩城 大輔¹、高橋 実¹、松下 操²、藤田 禎三¹

¹福島県立医大・医・免疫、CREST、²東海大・工・生命化学

特別講演 2

11:00~12:00

座長 堀内 孝彦

自然免疫系の活性制御機構

竹田 潔

九州大学生体防御医学研究所・発生工学分野

セッションD: TLR

13:30~14:45

座長 井上 徳光、松本 美佐子

D-1 癌から分泌される低分子物質による自然免疫応答増強メカニズム (1)

藪 政彦¹、志馬 寛明¹、松本 美佐子²、瀬谷 司²、井上 徳光¹

¹大阪府立成人病センター研究所・分子遺伝学部門、

²北海道大学大学院医学研究科・感染症制御学分野

D-2 癌から分泌される低分子物質による自然免疫応答増強メカニズム (2)

志馬 寛明¹、藪 政彦¹、松本 美佐子²、瀬谷 司²、井上 徳光¹

¹大阪府立成人病センター研究所・分子遺伝学部門、

²北海道大学大学院医学研究科・感染症制御学分野

D-3 抗がん免疫エフェクター起動における樹状細胞 Toll-like receptor の役割

瀬谷 司

北大・医・感染制御

D-4 NK活性化に必要なアジュバントの機能と性質

瀬谷 司

北大・医・感染制御

D-5 Toll-like receptor homolog RP105 のコラーゲン関節炎における作用

多田 芳史¹、小荒田 秀一¹、大田 明英²、長澤 浩平¹

¹佐賀大学医学部膠原病・リウマチ内科、²看護学科

セッションE: GPIアンカー、CD46、C5a

14:45~15:45

座長 岡田 秀親、牟田 耕一郎

E-1 遺伝性 GPIアンカー欠損症

木下 タロウ¹、村上 良子¹、前田 裕輔¹、Antonio Almeida²、Anastasios Karadimitris²

¹大阪大学微生物病研究所 免疫不全、

² Department of Haematology, Imperial College London, Hammersmith Hospital, UK

E-2 GPI イノシトール脱アシル酵素欠損マウスは雄性不妊を示す

植田 康敬^{1,3}、前田 裕輔¹、山口 亮²、伊川 正人²、岡部 勝²、木下 タロウ¹

¹大阪大学微生物病研究所 免疫不全、

² 大阪大学微生物病研究所附属 遺伝情報実験センター、

³大阪大学大学院医学系研究科分子病態内科学講座

E-3 同種リコンビナントCD46免疫による、自己抗CD46抗体産生ラットモデルと不妊への影響について

水野 正司^{1,2}、Claire L. Harris¹、B. Paul Morgan¹、松尾 清一²

¹カーディフ大学医学部医学生化学&免疫学講座、²名古屋大学大学院大学腎臓内科学講座

E-4 補体C5aリセプターを介したアポトーシス増幅および抑制機構

西浦 弘志、山本 哲郎

熊本大学大学院医学薬学研究部分子病理分野

Clinical development update on eculizumab, an anti-C5 terminal complement inhibiting humanized monoclonal antibody

Paul W. Finnegan, MD, CM, FRCPC, MBA, Vice President,

Alexion Pharmaceuticals, Inc., Cheshire, CT, USA

Eculizumab, an anti-C5 terminal complement inhibiting humanized monoclonal antibody, has completed a Phase III efficacy trial with positive results in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and has also completed enrollment in a Phase III safety trial. In addition, eculizumab is in preclinical development for severe refractory asthma and in pre-sensitized renal allotransplant patients who thus have a high risk for rejection or denial of transplantation therapy.

PNH is an acquired genetic disorder resulting in the clonal expansion of somatically mutated hematopoietic stem cells with a deficiency of cell surface glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins. Absence of the GPI-anchored proteins, particularly the terminal complement inhibitor CD59, from the surface of erythrocytes results in chronic intravascular hemolysis, the main pathophysiology of PNH. Excessive or persistent intravascular hemolysis can result in anemia, fatigue, thrombosis, pain, pulmonary hypertension, poor quality of life (QoL), and frequently a dependency on transfusions to maintain hemoglobin levels. Currently there are no approved or effective therapies that reduce intravascular hemolysis and improve the associated clinical morbidities in PNH.

The pivotal phase III clinical study, TRIUMPH (Transfusion Reduction Efficacy and Safety Clinical Investigation, Randomized, Multi-Center, Double-Blind, Placebo-Controlled, Using Eculizumab in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria), evaluated the efficacy and safety of eculizumab compared to placebo in a cohort of PNH patients treated with stan-

dard care. 87 patients were randomized (1:1) to receive either placebo or eculizumab administered intravenously at 600 mg weekly for 4 weeks and then 900 mg every 2 weeks commencing the fifth week for a total of 6 months of therapy. The co-primary endpoints were stabilization of hemoglobin levels and reduction in transfused blood units.

Both primary endpoints were met with statistical significance: 1) stabilization of hemoglobin levels was achieved by 48.8% of eculizumab-treated patients and by 0% of placebo-treated patients ($P=0.000000014$); 2) median transfused packed red blood cells (PRBCs) were 0 units in the eculizumab-treated group compared with 10 units in placebo ($P=0.0000000006$). Fifty-one percent of eculizumab-treated patients were transfusion-independent through week 26 (study end), while every placebo-treated patient received at least one transfusion by week 14 ($P=0.000000005$). Eculizumab treatment reduced intravascular hemolysis, as evidenced by an 85.8% decrease in the lactate dehydrogenase area under the curve relative to placebo ($P<0.0000000001$). Concomitantly, eculizumab treatment resulted in an increase in the proportion of PNH type III RBCs from 28.1% at baseline to 56.9% by week 26 while the proportion in the placebo group remained constant ($P=0.00005$). Pre-specified measures of QoL were statistically improved as well. The 2 most common adverse events in the trial were headache and nasopharyngitis.

Preclinical results for eculizumab in animal models for severe asthma and pre-sensitized renal transplantation will be presented.

自然免疫系の活性制御機構

竹田 潔

九州大学生体防御医学研究所・発生工学分野

Regulation of innate immune responses

Kiyoshi Takeda

Department of Molecular Genetics, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University

近年、Toll-like receptor (TLR) ファミリーの機能解析により、自然免疫系の活性化機構が明らかになってきた。TLR1-TLR11までの各ファミリーメンバーが、それぞれ異なる病原体構成成分を認識し、自然免疫系の活性化だけでなく、抗原特異的な獲得免疫系の誘導を促す¹。TLRを介した細胞内シグナル伝達は、ファミリー間で保存された細胞質内のToll/IL-1 receptor (TIR) ドメインから開始される。その下流でもTIRドメインを有するアダプター群(MyD88, TIRAP, TRIF, TRAM)が重要な役割を担っていることも明らかになり、自然免疫系の活性化機構の概要が明らかになってきた²。

自然免疫系の活性は通常絶妙に制御されているが、その制御機構が破綻し、異常活性化が続くと、慢性炎症性腸疾患の発症につながる事が、IL-10ノックアウトマウスや自然免疫系特異的なStat3欠損マウスなどの解析から示されている³。このモデルマウスに、TLR4の変異を導入すると、慢性大腸炎の発症が抑制される⁴。これらの結果は、TLRを介した自然免疫系の活性化が、生体において慢性炎症の最初のトリガーとなりうることを示唆している。実際、大腸粘膜に局在する自然免疫担当細胞は、正常マウスではTLR刺激に不応答であるが、大腸炎を発症するStat3変異マウスやIL-10ノックアウトマウスでは、有意にTLR刺激に対する反応性が認められ、TLRに対する反応性が大腸炎の病態と相関している。そこで、正常マウス由来の大腸局所の自然免疫担当細胞がTLRに不応答になる分子機構を明らかにするため、正常マウスとIL-10ノックアウトマウスの細胞間で、遺伝子発現の差を、DNAチップを用いて網羅的に解析した。その結果、核に局在するI κ B分子(Bcl-3, I κ BNS)が、正常マウスの大腸局所の自然免疫担当細胞に特異的に発現していることを見出した^{5,6}。細胞レベル、ノックアウトマウスを用いた解析から、Bcl-3, I κ BNSが自然免疫系細胞において、TLR

による遺伝子発現を、それぞれ選択的に抑制していることが明らかになった⁷。本講演では、核に局在するI κ B分子による自然免疫系の活性制御機構を中心に議論したい。

[参考文献]

- 1) Takeda K. et al. *Annu. Rev. Immunol.* 21: 335 (2003)
- 2) Takeda K et al. *Int. Immunol.* 17: 1 (2005)
- 3) Takeda K. et al. *Immunity* 10: 39 (1999)
- 4) Kobayashi M. et al. *J. Clin. Invest.* 111: 1297 (2003)
- 5) Kuwata H. et al. *Blood* 102: 4123 (2003)
- 6) Hirofumi T. et al. *J. Immunol.* 174: 3650 (2005)
- 7) Kuwata K. et al. *Immunity* 24: 41 (2006)

MBL補充療法

松下 操

東海大学・工学部・生命化学科

MBL-replacement therapy

Misao Matsushita

Tokai University, Department of Applied Biochemistry

自然免疫において生体防御レクチンが異物認識分子として働き、病原体表面糖鎖に結合する。その結果種々の免疫応答が引き起こされる。マンノース結合レクチン(MBL)は生体防御レクチンの一つであり、セリンプロテアーゼMASPとの複合体として血清中に存在する。MBL-MASP複合体がMBLを介して病原体に結合すると、MASPによりC4とC2が活性化される(レクチン経路)。ヒトMBLは細菌、ウイルス、マイコプラズマ、原虫、真菌など、広範囲の病原体に結合し、*E. coli*、*Salmonella typhimurium*、*Neisseria meningitidis*、*HIV*、*Cryptosporium parvum*などではレクチン経路が活性化されることが示されている。MBLが結合する成分には、LPS、ペプチドグリカン、ウイルス糖鎖などがある。MBLはMASPとの複合体で補体レクチン経路を活性化するのみでなく、MBL自身がオプソニンとしても機能する。感染防御におけるMBLの重要性が推察されるが、実際にMBLのSNPsが易感染性につながることを知られている。コラーゲン様領域をコードするMBL遺伝子のコドン52、54、57のいずれかの点変異の結果、産生されるMBL蛋白質は正常なオリゴマー構造にはならず低分子量の形態をとる。ELISAの測定では異常低値を示し、機能的なMBL欠損となる。また、MBL遺伝子のプロモーター領域に種々の多型性があり、それらの組み合わせも血清MBL量に関係している。MBL欠損は獲得免疫系が未発達な乳幼児において感染のリスクファクターとなる。一方、大規模な疫学的な研究から、成人ではMBL欠損が易感染性に繋がらないとの報告がある。しかし、免疫機能の低下した状態においては成人でもMBL欠損が感染のリスクファクターとなると考えられている。ノックアウトマウスを用いた研究からは、マウスでMBLが*Staphylococcus aureus*の感染防御に働いていることが示されている。

易感染性のMBL欠損者に対しMBL補充療法がヨーロッパで試みられており、感染予防への効果が報告されている¹⁾。我々はMBL補充療法の分子基盤を明らかにする目的で、MBL欠損血清を用いて解析を現在行っている。その結果、MBL欠損血清にはマンナンで開始するレクチン経路の活性化能はないが、リコンビナントMBLの添加によりレクチン経路が活性化することが判明した。これは、添加したMBLとMBL欠損血清中のMASPが再構成することを示唆している。

[参考文献]

- 1) Valdimarsson, H. et al Scand. J. Immunol. 48, 116-123, 1998.

抗補体薬をめぐる最近の話題 — sCR1を中心に

松尾 清一、水野 正司
名古屋大学院大学 腎臓内科

A current review of anti-complement therapy –Spot to soluble CR1 (sCR1)
Seiichi Matsuo, Masashi Mizuno
Department of Nephrology, Nagoya University Graduate School of Medicine

補体は innate immunity の一部として、微生物、異常細胞等、生体に対して悪影響を及ぼす異物から、生体を守るといった、生体維持について重要な役割を果たしている。一方で、各種疾患においては、補体の過度の活性化が生じる可能性があり、これが、様々な炎症性疾患、変性性疾患、腫瘍性疾患の発症・病態の増悪に深く関わっていることも知られている。動物モデルにおいて、全身および局所の補体活性を抑制することで、疾患発症抑制、増悪抑制に良好な結果を示されている。この様な事実に基づき、これまでに各種病態における様々な抗補体薬開発と臨床応用の可能性が追及されてきた。

プロトタイプの可溶性 complement receptor 1 (sCR1) は、全身的に補体活性経路全体を抑制し、腎炎、関節炎、皮膚炎、敗血症、虚血後再灌流等、様々な炎症疾患動物モデルで良好な結果をもたらした。プロトタイプの可溶性 complement receptor 1 (sCR1) は、第一世代の抗補体薬に分類され、臨床応用を期待され開発された、歴史的抗補体薬のひとつである。プロトタイプの sCR1 については、これまで臨床試験で残念ながらめざましい効果は報告されていないが、我々の腎障害・関節炎・ショックに対する効果を含め、各種疾患モデルについて、外部からの補体活性の制御が病態改善に有効な手段となりうることを示した重要な抗補体薬の一つである。確かに生体のコントロールを過剰に逸した場合には、敗血症の様に致死的反応すら起こす。しかし、その一方で、補体欠損が疾患発症・進展に結びつく可能性のあること、また補体遺伝子ノックアウトが、むしろ生体に重大な問題を引き起こすことも示されてきている。このため、最近の第二世代の抗補体薬の開発では、より選択的分布、選択的作用基点、作用時間を考えた新しい抗補体薬の開発が行われている。ここでは、sCR1 を中心に、各種動物実験における抗補体薬の

エビデンス、各種病態に基づく抗補体薬の臨床応用への今後の可能性について考えてみたい。

【参考文献】

- 1) Weisman HF. et al., Science 13:249 (1990)
- 2) Lehmann TG. Et al. Transplantation 66:717 (1998)
- 3) Nomura A. et al., Am J Pathol 151:539 (1997)
- 4) Morita Y. et al., J Am Soc Nephrol 8:1363 (1997)
- 5) Matsuo S. et al., Nephrol Dial Transplant 13:2723 (1998)
- 6) Mizuno M. et al., Clin Exp Immunol 119:368 (2000)
- 7) Mizuno M. et al., Int Arch Allergy Immunol 127:55 (2002)
- 8) Morgan BP. et al., Mol Immunol 40:159 (2003)
- 9) Thomas LJ. et al., Glycobiology 14:883 (2004)
- 10) Mizuno M. et al., Curr Drug Targets Inflamm Allergy 3:87 (2004)
- 11) Souza DG. et al., Br J Pharm 145:1027 (2005)

C1-インヒビター

森勢 裕

ZLB ベーリング株式会社 製品開発部

C1-Inhibitor

Hiroshi Morise

ZLB Behring K.K. Product Development Department, Tokyo, Japan

C1-Inhibitorは、478個のアミノ酸で構成される分子量約105,000の糖タンパク質で、 $\alpha 2$ グロブリン画分に存在しセリンプロテアーゼに属する血漿タンパク質である。この物質は、補体の活性化C1をはじめとして血液凝固線溶系の活性化第XII因子、活性化第XI因子、プラスミンおよびカリクレインに対して1:1で結合し阻止作用を有する阻害剤である。

遺伝性血管性浮腫(Hereditary angioedema, HAE)は、常染色体優性遺伝形式をとり補体C1の阻害剤であるC1-Inhibitorの血漿タンパク量の減少あるいは機能異常に基づかれて発症する一過性、反復性の粘膜下の浮腫を主徴とし、まれではあるが高い致死率を持った疾患である。HAEには、3つのタイプすなわちType 1、Type 2、Type 3があり、C1-Inhibitorの血漿タンパク量および活性の低下が認められるType 1、血漿タンパク量は正常であるが活性が低下しているType 2、血漿タンパク量および活性ともに正常であるType 3がある。Type 3は、C1-Inhibitorの血漿タンパク量および活性は正常であるが女性だけに発生する血管性浮腫でありおそらく女性ホルモンのエストロゲンに依存していると考えられている。

遺伝性血管浮腫に対する治療は、症状と部位に依存するようであるが、重篤な呼吸障害を引き起こしている咽頭浮腫の場合では、気管内挿管や気管切開を施行する。急性発作の場合は、C1-Inhibitor濃縮製剤(Beriner[®]P, ZLB Behring)を投与するか、またはC1-Inhibitor濃縮製剤が利用可能でないならば新鮮凍結血漿で代用する。C1-Inhibitor濃縮製剤を投与した場合、発作は数時間以内に消失する。

C1-Inhibitor濃縮製剤は、各種ウイルススクリーニングに加えプールした試験血漿にてHIV、HBVおよびHCVについて核酸増幅検査(NAT)を実施し、適合した血漿を原料血漿とし製造されている。その後、製造工程で60℃、10時間の液状加熱処理も施行されHIVをはじめとする各種ウイルス除去・不活化効果が確認

されている。

本剤は、国際的に1977年からまずドイツで市販され本邦では1990年から市販されている。

本剤は、発売以来Type 1およびType 2の遺伝性血管性浮腫の急性期発作に対する有効かつ安全な治療薬として医療に貢献してきたわけであるが、最近、遺伝性血管性浮腫の患者の腹部発作に対するC1-Inhibitorの有効性・安全性がレトロスペクティブに検討され有効性・安全性が再確認されているのでその結果も紹介する。

[参考文献]

Agstoni A. et al., J Allergy and Clin Immunol 114:S51(2004)

C5a アナフィラトキシン阻害ペプチドに関する研究

岡田 則子¹、朝井 鈴佳¹、堀田 彩¹、三浦 典子²、大野 尚仁²、Imre Farkas¹、Lewis Hau¹、
藤田 恵美子¹、岡田 秀親^{3,4}

¹名古屋市立大学大学院医学研究科生体防御学、²東京薬科大学薬学部免疫学、
³(株)蛋白質科学研究所、⁴福祉村病院長寿医学研究所

Studies on an inhibitory peptide of C5a anaphylatoxin

Noriko Okada¹, Suzuka Asai¹, Aya Hotta¹, Noriko Miura², Naohito Ohno², Imre Farkas¹, Lewis Hau¹,
Emiko Fujita¹, and Hidechika Okada^{3,4}

¹Dept Biodefense, Nagoya City Univ Grad Med Sci, ²Dept Immunol, Tokyo Univ Pharm Life Sci Sch
Pharm, ³Inst Protein Sci Co Ltd, ⁴Chojyu Med Inst, Fukushima Hospital

【はじめに】

C5a アナフィラトキシンはナノモルレベルで白血球系細胞や血管内皮細胞などを強力に活性化して生体防御反応を誘導拡大する因子である。その反面、過剰炎症反応に起因する多くの病態のリスクファクターとなっており、C5a の制御は敗血症や血管障害などの重篤な病態改善において重要であると考えられる。我々はC5a とC5aRの相互作用において、C5a の37-53番アミノ酸 (RAARISLGPRCIKAFTE) であるPL37 がC5aRと多点的に分子間センスーアンチセンスペプチド関係にあることを見だし、C5aRを介する生物活性発現に重要な部分であることを検証した。そこで、PL37 に対する相補性ペプチドを設計合成して検討した結果、相補性ペプチドPepAはC5aに結合してC5aの活性阻害効果のあることが判明した。

【方法および結果】

設計合成した PL37 相補性ペプチドの C5a 結合性を Surface Plasmon Resonance 法にて検討し、PepA に強い結合性が検出された。PL37 MAP ペプチドは C5aR 陽性ヒト neuroblastoma 由来 TGW 細胞にアポトーシスを誘導する。パッチクランプ法により膜電位変化を測定した結果、50uMPepA は 0.5uMPL37-MAP の効果を完全に阻害した。さらに、ラットに LPS-priming 後に抗 Crry 抗体 5I2 を静脈内投与すると、投与後 30 分までに全例がショック死する実験系において、4 mg/kg PepA 前投与において完全に救命された。マウスに *Candida albicans* water soluble extract 静脈内投与により急性死を誘導する系においてもアセチル化した AcPepA は有効であった。現在、サルでの LPS 投与によるショック死の救命に AcPepA が有効である事を検証中である。

【考察】

C5a 相補性ペプチド AcPepA は炎症病態改善剤としての可能性が高い。

経口投与可能な非ペプチド性低分子の強力なC5a受容体拮抗薬 —その創製と関節リウマチ治療薬としての可能性—

住近 浩、阪田 圭、最上 享、石淵 正剛、中村 光治、千葉 健治
三菱ウェルファーマ(株) 創薬研究本部 創薬第三研究所

Identification of a potent and orally available non-peptide C5a receptor antagonist: The approach for new drug of rheumatoid arthritis

Hiroshi Sumichika, Kei Sakata, Akira Mogami, Seigo Ishibuchi, Mitsuharu Nakamura and Kenji Chiba
Mitsubishi Pharma Corporation, Research Laboratory III (Immunology), Pharmaceuticals Research Division

補体成分C5a(以下C5aと略す)は74アミノ酸からなるポリペプチドで、補体系活性化(古典経路、第二経路およびレクチン経路)の結果生成される。その作用は好中球や他の白血球を強力に遊走する事、および、強力に炎症を誘導する事にある。すなわち、C5aはマスト細胞からのヒスタミン遊離、平滑筋の収縮、血管透過性の亢進、活性酸素種産生誘導、好中球と内皮細胞の接着の増強、炎症性サイトカイン(IL-1、IL-6、IL-8、TNF- α 等)産生の誘導、液性および細胞性免疫の増強を引き起こす。これらの作用はC5aが標的細胞上のGタンパク質共役型のC5a受容体(以下C5aRと略す)に結合する事によって発揮される。また、C5a/C5aRの亢進は関節リウマチ⁽¹⁾⁽²⁾、全身性エリテマトーデス⁽³⁾⁽⁴⁾、虚血再灌流傷害⁽⁵⁾、および敗血症⁽⁶⁾のような様々な疾患で報告されている。同様に、動物モデルにおいてもC5a/C5aRの疾患における関与が示されている。例えば、マウスにおけるII型コラーゲン誘導関節炎において、抗C5抗体は病態の誘導期に投与すると発症をほぼ完全に抑制し、発症後に投与した場合には病状を改善する⁽⁷⁾。また、抗C5抗体は抗グルコース6-リン酸イソメラーゼ自己抗体(抗GPI抗体)によって誘導されるK/BxNマウスにおける関節炎モデルにおいても治療効果を示す⁽⁸⁾。さらに、C5aR欠損マウスでは抗GPI抗体誘導性関節炎は誘導されない。つまり、C5のもう一方の構成成分であり、膜侵襲性複合体の構成成分となるC5bではなくC5aの方が関節炎の進行に重要であることが示されている。

以上のような知見をもとに、C5a/C5aRの作用を阻害するC5aRアンタゴニストの探索が1980年代からなされ、漸く近年になって強力なアンタゴニストが見出されてきた(表1)⁽⁹⁾。これらの中で、我々の創製したW-54011は非ペプチド性の低分子化合物であり、医薬品として好ましい構造を有している⁽¹⁰⁾。本化合物はヒト好中球をヒトC5aで刺激した際の細胞内Ca²⁺上昇、

活性酸素種の産生および遊走に対して、ペプチド性アンタゴニストであるPMX53や抗C5aR抗体よりも強力な抑制作用を示した。その作用には種差があり、ヒト以外ではサルおよびスナネズミのC5aRに対して強力な拮抗作用を示したが、マウス、ラット、ウサギ、モルモットおよびイスでは作用を全く示さなかった。そこで、カンクイザルにおけるII型コラーゲン誘導関節炎を用いて本化合物の経口投与による治療効果を評価した。その結果、治療投与開始の2日後から関節腫脹が有意に抑制され、関節破壊も抑制されることが示唆された。

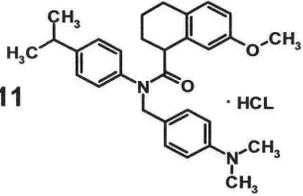
一方、W-54011の作用発現にC5aRのどの部位が重要かを探索するために、スナネズミのC5aRをクローニングし、他種のC5aRのアミノ酸配列と比較した。その結果、本化合物の反応種(ヒト、サル、スナネズミ)に共通で、かつ、非反応種において異なるC5aRの部位は第5膜貫通領域の2つのアミノ酸(ヒトではLeu209とTrp213)および細胞外第2ループの1つのアミノ酸(ヒトではGlu179)に集約された。そこで、この情報を基にしてC5aR変異体を構築し、解析した結果、W-54011のC5aRアンタゴニスト作用はC5aRの第5膜貫通領域のTrpに強く依存していることが明らかとなった。

本シンポジウムでは、W-54011の薬理作用を紹介するとともに、関節リウマチにおける補体をターゲットとした治療戦略の意義について概説する。

[参考文献]

- 1) Jose P. J. et al., Ann Rheum Dis 49: 747 (1990).
- 2) Hogasen K. et al., J Rheumatol 22: 24 (1995).
- 3) Spronk P. E. et al., Lupus 4: 86 (1995).
- 4) Matsuki Y. et al., J Clin Apheresis 13: 108 (1998).

- 5) Pemberton M. et al., J Immunol 150: 5104 (1993).
- 6) Nakae H. et al., Surg Today 26: 225 (1996).
- 7) Wang Y. et al., Proc Natl Acad Sci U S A 92: 8955 (1995).
- 8) Ji H. et al., Immunity 16: 157 (2002).
- 9) Sumichika H., Curr Opin Investig Drugs 5: 505 (2004).
- 10) Sumichika H. et al., J Biol Chem 277: 49403 (2002).

Origin	C5aR antagonist	Type
Promics	PMX53, AcPhe-[Orn-Pro-D-Cha-Trp-Arg]	cyclic peptide
Mitsubishi	 W-54011 · HCL	non-peptidic small molecule
Novartis	C5aRAM, C5a(1-71)Thr ¹ Met,Cys ²⁷ Ser,Gln ⁷¹ Cys, monomer	C5a mutant
	C5aRAD, C5a(1-71)Thr ¹ Met,Cys ²⁷ Ser,Gln ⁷¹ Cys, dimer	
Medical school Hannover, Germany	ΔpIII-A8, C5a(1-66)-Phe ⁶⁷ -Lys ⁶⁸ -Arg ⁶⁹ -Ser ⁷⁰ -Leu ⁷¹ - Leu ⁷² -Arg ⁷³	C5a mutant

(表1) 近年見出され、*in vivo*における作用の確認されているC5a受容体アンタゴニスト

血液透析患者における mannose-binding lectin (MBL) 欠損の割合とその意義

恩田 紀更¹、大井 洋之¹、若林 道郎¹、玉野 まり子¹、大澤 勲¹、若林 正則²、富野 康日己¹
¹順天堂大学医学部腎臓内科 ²望星第一クリニック

Clinical significance of mannose-binding lectin deficiency in patients on maintenance hemodialysis
 Kisara Onda¹, Hiroyuki Ohi¹, Michiro Wakabayashi¹,
 Mariko Tamano¹, Isao Ohsawa¹, Masanori Wakabayashi², Yasuhiko Tomino¹
¹Division of Nephrology, Department of Internal Medicine, Juntendo University School of medicine
²Bousei Daiichi Clinic

【目的】

血液透析患者は、易感染性であり、感染症は透析患者の死亡原因の上位を占めている。MBLは自然免疫における重要な成分であり、病原体の糖鎖に結合し、補体活性を惹起させ微生物を排除する。すでに、MBL欠損の原因となる遺伝子変異は同定されており¹、MBL欠損・低値が感染・敗血症のリスクとなるといわれている。本邦の健常者のMBL欠損も5-20%と報告されているが²、MBL欠損が血液透析患者の易感染性にも関係している可能性が考えられる。今回、我々は血液透析患者のMBL欠損の割合とMBL欠損者の臨床的意義を検討した。

【対象・方法】

対象は血液透析患者261名(糖尿病性腎症169名、非糖尿病性腎症92名)で、患者新鮮血を3000rpm、4℃、10分間遠心分離後、上清を-80℃に保存した。血清MBL濃度をELISA (MBL-oligomer ELISA kit® ANTIBODYSHOP)で測定した。さらに血清MBL濃度50ng/ml以下の症例に対し、各補体経路活性化能を補体活性経路測定キット (Wielisa®-kit Wieslab Ideon Research Park)で測定した。MBL遺伝子解析は、患者白血球よりQIA amp DNA mini kit (QIAGEN CO.)を用いてDNAを抽出し、MBL遺伝子のexon1のコードン52、54、57のアミノ酸変異とプロモーター - 550・ - 221の1塩基置換の有無について塩基配列を調べた。血液透析患者の血清MBL濃度と臨床データを比較検討した。

【結果】

血液透析患者の血清MBL濃度は2297.3 ± 1517.3ng/ml(糖尿病性腎症2340.7 ± 1506.8ng/ml、非糖尿病性腎症2217.7 ± 1541.7ng/ml)で、糖尿病性腎症と非糖尿病性腎症の間に有意な差はなかった。血液透析患者261名の

うち、血清MBL濃度50ng/ml以下の低値例は24名(9.2%)であった。低値例前例でlectin pathwayの活性化はみられず、MBL遺伝子コードン54、プロモーター - 550に変異が認められた。MBL欠損の糖尿病性腎症または非糖尿病性腎症、MBL非欠損の糖尿病性腎症または非糖尿病性腎症の4グループで臨床データ(WBC、RBC、Hb、CRP、TP、Alb)を比較したが、有意な関連は認められなかった。経過観察ができたMBL欠損者15名のうち4名が導入後平均3.5年で死亡しており、そのうち2名は感染症が原因であった。

【結論】

血液透析患者におけるMBL欠損者の割合は、本邦の健常者における欠損者の割合と同等であった。MBL欠損の血液透析患者は、易感染性が予想され、予後不良の可能性が考えられた。

【参考文献】

- 1) Turner MW., Immunol Today 17:532 (1996)
- 2) Horiuchi T. et al., Genes and Immunity 6:162(2005)

血液透析患者の血清MBL濃度

	MBL濃度 (ng/ml)	50ng/ml以下
全血液透析患者 (261名)	2297.3±1517.3	24名 (9.2%)
糖尿病性腎症 (169名)	2340.7±1506.8	17名 (10.1%)
非糖尿病性腎症 (92名)	2217.7±1541.7	7名 (7.6%)

MBL低値例の補体経路活性化能(n=24)

case	Classical pathway	Lectin pathway	Alternative pathway
	%	%	%
1	105.3	0.0	95.0
2	156.5	0.7	122.7
3	155.6	0.3	148.7
4	109.3	0.5	97.9
5	113.3	0.0	72.0
6	102.1	0.0	83.2
7	140.5	0.2	107.9
8	107.1	0.0	120.7
9	114.0	0.0	115.1
10	114.8	0.4	131.8
11	52.1	0.3	82.8
12	48.0	0.4	70.2
13	96.4	0.0	121.3
14	101.5	1.0	106.5
15	115.5	0.2	100.0
16	71.9	0.0	77.0
17	148.4	0.8	100.3
18	70.1	0.9	92.5
19	85.1	0.0	75.3
20	46.7	1.2	0.1
21	113.8	1.3	131.7
22	76.2	0.9	127.7
23	78.1	0.8	76.9
24	83.9	0.1	50.6
mean±SD	100.3±31.3	0.4±0.5	96.1±31.6

炎症性皮膚疾患でのC5aR及びC5L2発現の検討

佐藤 典子¹、阿部 正義²、竹下 重盛³、今山 修平⁴、中山 樹一郎¹

¹福岡大学医学部皮膚科学 ²同薬理学 ³同病理学 ⁴九州医療センター皮膚科

An immunohistochemical study for C5aR and C5L2 expressions in inflammatory skin lesions

Noriko Sato^{1*}, Masayoshi Abe², Morishige Takeshita³, Shuhei Imayama⁴,

Juichiro Nakayama¹

¹Department of Dermatology, Faculty of Medicine, Fukuoka University, Fukuoka, Japan

²Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Fukuoka University, Fukuoka, Japan

³Department of Pathology, Faculty of Medicine, Fukuoka University, Fukuoka, Japan

⁴National Hospital Organization Kyushu Medical Center, Japan

【はじめに】

炎症性皮膚疾患において産生されたC5aは、白血球遊走、エイコサノイドの産生刺激、接着分子の発現等を介して炎症の進展に深く関与すると考えられている。また、炎症性皮膚疾患患者の鱗屑から、高濃度のC5a desArgが抽出されたという報告がある¹。C5a受容体(C5aR)は、好中球、単球等の白血球上に発現し、患者血清中や皮膚部で産生されたC5aに反応して遊走すると考えられる。2型のC5aRとされるC5L2は、主に顆粒球に発現し²、C5a/C5a desArg、あるいはC3aが結合するが³、C5L2欠損マウスを用いた研究では、C5aの腹腔内投与による好中球浸潤が野生株に比し亢進すること等より、“おとり受容体”として機能する可能性が報告されている⁴。しかしながら、両受容体の発現を皮膚疾患で検討した報告はみられない。今回、いくつかの炎症性皮膚疾患で、C5aRとC5L2の発現を組織学的に検討したので考察も加えて報告する。

【対象及び方法】

18名の炎症性皮膚疾患患者(乾癬5名、アトピー性皮膚炎7名、アナフィラクトイド紫斑3名、他3名)の皮膚病理組織切片を用いてC5aRとC5L2の発現の局在と強度を免疫組織化学的に検討した。2名(基底細胞癌1名、表皮のう腫1名)から抽出された皮膚組織中の正常部位を対照として用いた。

【結果】

正常組織ではC5aR抗体による免疫染色では陰性であったが、C5L2抗体では骨髄由来細胞(白血球)に軽度陽性であった。炎症性の皮膚組織では、C5aRとC5L2の発現は、組織に浸潤している好中球、好酸球、単球に陽性であった。C5aRとC5L2の陽性率(浸潤白血球に対して)を調べると、各疾患群で両蛋白の

発現に正の相関を認め、さらに各疾患群で陽性率が異なる可能性が示唆された。

【考察】

C5aR、C5L2の発現率の違いは、浸潤細胞数の差よりも、病態の違いを反映している可能性が考えられる。

【参考文献】

- 1) Bergh K. et al., Arch Dermatol Res 285:131(1993)
- 2) Ohno M. et al., Mol Immuno 37: 407 (2000)
- 3) Cain SA. et al., J Biol Chem 277: 7165 (2002)
- 4) Gerard NP et al., J Biol Chem 280:39677 (2005)

SLE患者における感染症とMBL欠損症の関連の検討

内野 愛弓、塚本 浩、堀内 孝彦、三苦 弘喜、
宮城 友豪、民本 泰浩、木本 泰孝、宮川 弘、原田 実根
九州大学大学院病態修復内科学分野(第一内科)

Mannose-binding lectin deficiency and risk of infection
in patients with systemic lupus erythematosus

Ayumi Uchino, Hiroshi Tsukamoto, Takahiko Horiuchi, Hiroki Mitoma,
Yugo Miyagi, Yasuhiro Tamimoto, Yasutaka Kimoto, Hiroshi Miyagawa, Mine Harada
Department of Medicine and Biosystemic Science,
Kyushu University Graduate School of Medical Sciences, Fukuoka, Japan

【背景・目的】

膠原病患者は、治療薬の影響のみならず、個人が本来有する免疫異常が原因となって生じた感染防御能低下状態にあることが一般に知られ、臨床の場においても、感染症の併発は重要な問題として捉えられている。今回当教室では、当科SLE患者における感染症の併発状況、及び、患者背景との関連について調査を行った。その際、免疫異常をきたす遺伝的要因の一つとして、補体レクチン経路の活性化において重要な役割を担い、感染症発症や自己免疫疾患、中でもSLE発症との相関が示唆される分子であるMBLに着目し、その欠損症と感染症併発の関連についても検討を行ったので報告する。

【対象・方法】

2000年から2004年の過去5年間に、当科入院となったSLE患者152例を対象として、感染症併発の有無及び分類を調査するとともに、治療との関連を検討した。更に、遺伝子解析に対する同意及び協力を得た69例を対象として、PCR-SSCP法を用いたMBL遺伝子コドン54の多型検索を施行し、感染症併発との関連を検討した。

【結果】

感染症併発は49例(32.2%)に認められ、その内訳は細菌性14例、ウイルス性11例、真菌・原虫性15例(重複感染あり)であった。感染症による死亡は1例であり、カリニ肺炎によるものであった。日和見感染症を25例と高率に認める点、また、発症に至らないながらも、サイトメガロ抗原血症8例、高 β -Dグルカン血症5例を認める点が特徴的であった。MBL遺伝子解析結果は、正常型(A/A)31例、ヘテロ型(A/B)34例、欠損型(B/B)1例であった。危険因子の検討では、高用量副腎皮質ホルモン剤投与量との関連が示唆され

たが、MBL欠損症との関連は認めなかった。

【考察】

従来の報告同様、当科SLE患者においても副腎皮質ホルモン剤投与量と感染症併発の間に相関を認めた。我々は、血液疾患に対する大量化学療法における重症感染症とMBL欠損症の関連を報告したが、SLEにおける感染症併発との関連は明らかではなかった。

【文献】

- 1) Horiuchi T. et al., Genes Immun. 6:162 (2005)

抗TNF- α 製剤の補体依存性および抗体依存性細胞障害効果の検討

三苫 弘喜、堀内 孝彦、民本 泰浩、木本 泰孝、内野 愛弓、塚本 浩、原田 実根
九州大学大学院病態修復内科学分野（第一内科）

Cytotoxic activity of anti-TNF agents, infliximab, etanercept, and adalimumab; complement-dependent cytotoxicity (CDC) and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC)

Hiroki Mitoma, Takahiko Horiuchi, Yasuhiro Tamimotov, Yasutaka Kimoto, Ayumi Uchino, Hiroshi Tsukamoto, Mine Harada

Department of Medicine and Biosystemic Science,

Kyushu University Graduate School of Medical Sciences, Fukuoka, Japan

【はじめに】

TNF- α (TNF) は、様々な炎症や免疫反応の場で重要な役割を担うサイトカインであり、慢性炎症性疾患の病態形成に深く関与している。そのため可溶性TNFを中和することを目的として、infliximab(抗TNFキメラ抗体)、adalimumab(完全ヒト型抗TNF抗体)の2種類の抗体製剤およびetanercept (TNF2型受容体とIgGの融合蛋白)が開発され、関節リウマチでは画期的な臨床効果をあげている。しかし、抗体製剤と可溶性受容体ではCrohn病における臨床効果に大きな差異があること、結核の発症率が異なること、などが明らかとなり、作用機序のさらなる解明が望まれている。当研究室では従来より、可溶性TNFの前駆体である膜型TNFの生物学的作用に着目し、膜型TNFを発現した細胞自身へ抗体単独で内向きのシグナル(reverse signal)を伝達することを明らかにしてきた(T細胞におけるIL-2産生の亢進¹、E-selectinの発現²、アポトーシス、細胞周期の停止³など)。今回、抗TNF製剤の膜型TNFを介する細胞効果を、CDC、ADCCに焦点を絞って3製剤を比較検討した。

【方法】

1) ヒトT細胞株であるJurkat細胞に膜型TNF遺伝子を導入した。2) 膜型TNF導入細胞を用いて、抗TNF製剤の膜型TNFへの結合能を検討した⁴。3) 補体またはNK細胞存在下に、抗TNF製剤を膜型TNF導入細胞に作用させ(37℃、3時間)、細胞障害活性を検討した。

【結果】

3製剤とも膜型TNFに対する結合能を有していた。抗体製剤であるinfliximabとadalimumabは補体およびNK細胞存在下に膜型TNF発現細胞への細胞障害活性を示した。一方、etanerceptはNK細胞存在下では抗体製剤とほぼ同等の細胞障害活性を示し

たが、補体存在下での細胞死の誘導は、抗体製剤と比較して著しく低かった。

【考察】

上記の結果からinfliximabとadalimumabはTNF発現細胞への直接的細胞障害活性(CDC, ADCC)を有し、より強い抗炎症効果を発揮することが証明された。このことは、抗体製剤と可溶性受容体のCrohn病における臨床効果の相違や、結核発症率の差を生み出す機序の一つと考えられる。

【参考文献】

- 1) Higuchi M. et al., Clin Immunol Immunopathol 82: 133(1997)
- 2) Harashima S. et al., J Immunol 166: 130 (2001)
- 3) Mitoma H. et al., Gastroenterology 128(2): 376(2005)
- 4) Mitoma H. et al., Gastroenterology 126(3): 934(2004)

全身性エリテマトーデス疾患感受性遺伝子としての補体遺伝子C3

宮川 弘¹、山井 美沙²、坂口 大志²、塚本 浩¹、古郷 功³、上田 章⁴、

吉澤 誠司⁵、田平 知子²、原田 実根¹、林 健志²、堀内 孝彦¹

¹九州大学大学院病態修復内科学分野 (第一内科)、²九州大学生体医学防御研究所

³北九州市立医療センター内科、⁴県立宮崎病院内科、⁵宗像医師会病院内科

Association of complement component C3 with susceptibility to systemic lupus erythematosus
Hiroshi Miyagawa¹, Misa Yamai², Daishi Sakaguchi², Hiroshi Tsukamoto¹, Isao Furugo, Akira Ueda,
Seiji Yoshizawa, Tomoko Tahira², Mine Harada¹, Kenshi Hayashi², Takahiko Horiuchi¹
Department of Medicine and Biosystemic Science, Graduate School of Medical Sciences and Medical Institute of Bioregulation; Kyushu University, ³Kitakyushu Manucipal Hospital, ⁴Miyazaki Prefectural Miyazaki Hospital, ⁵Munakata Medical Association Hospital

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a complex autoimmune disorder involving multiple organ systems. Genetic predisposition plays a crucial role in its initiation and development. Though a number of susceptibility loci and genes for SLE have been suggested through intensive investigations, the complexity of genetic basis has yet to be unraveled. We performed association studies for 53 genes involved in antigen/immune complex clearance, lymphoid signaling, apoptosis, and epitope modification to assess their contribution to the susceptibility to SLE. We searched SNPs in exons and putative promoter regions in 24 chromosomes and performed association studies on pooled DNAs of Japanese cases and controls under PLACE-SSCP based analysis system¹. After two separate analyses between one SLE (264 individuals) and two different controlpools (269 and other 426 individuals), we selected three genes, C3, CD28, and TNFRSF1A, as candidates that would confer susceptibility to SLE, because several markers of the three genes were associated with SLE. We then genotyped markers by sequencing genomic DNA of 192 patients and the same number of controls and reconstructed haplotypes in these three genes. We finally identified the haplotypes associated with the disease in the C3 region, which affected the average serum level of C3 pro-

tein. We concluded that we had identified the haplotype that can be considered to directly contain or be linked to the variants that cause SLE.

Reference

1. Sasaki T, et al. Am J Hum Genet 68: 214-8 (2001)

加齢黄斑変性の霊長類モデルの研究

岩田 岳¹、吉田 統彦¹、梅田 慎介¹、溝田 淳²、鈴木 通弘³、寺尾 恵治⁴、吉川 泰弘⁵、三宅 養三¹

¹独立行政法人国立病院機構東京医療センター臨床研究センター(感覚器センター)、²順天堂大学医学部浦安病院眼科、³社団法人予防衛生協会、⁴独立行政法人医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター、⁵東京大学大学院農学生命科学研究科

Takeshi Iwata¹, Tsunehiko Yoshida¹, Shinsuke Umeda¹, Atsushi Mizota², Michihiro Suzuki³, Keiji Terao⁴, Yasuhiro Yoshikawa⁵, Yoza Miyake¹

¹ National Institute of Sensory Organs, National Hospital Organization Tokyo Medical Center, ² Division of Ophthalmology, Juntendo University School of Medicine Urayasu Hospital, ³ The Corporation for Production and Research of Laboratory Primates, ⁴ Tsukuba Primate Research Center, National Institute of Biomedical Innovation. ⁵ Department of Biomedical Science, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

【はじめに】

黄斑は角膜と水晶体によって収束した光が網膜上で結像する領域で、光を感じる視細胞が最も密に集中する、視力を決定する重要な部位である。ここが障害されると著しい視力低下、ひいては失明に至る。代表的な疾患として加齢性の難治性疾患、加齢黄斑変性がある。加齢黄斑変性は米国では65歳以上で失明率が最も高い眼疾患であるが、日本でも急速な高齢化と生活の欧米化によって患者数は急増しており、その原因解明と予防・治療法の開発が急がれている。加齢黄斑変性の初期において網膜下にドルーゼンといわれる蓄積物が現れる。最近このタンパク質成分が解明され、補体活性成分の存在が明らかになった。補体の活性化の原因や補体の活性化を抑制することによる疾患の予防などの研究には動物モデルが必要になるが、黄斑は高い解像度の視力を獲得した霊長類でのみ発達し、通常の実験に使用されるマウスやラットなどの夜行性ゲツ歯類には存在しない。我々は霊長類医科学研究センターやフィリピン¹の霊長類施設において発見されたドルーゼンを発症する若年性と加齢性の2種類の霊長類モデルを発見し、その詳細な病理学的解析と遺伝子解析を行い、網膜下における補体の活性化を確認した。

【方法】

若年性の疾患個体が含まれる家系については全てのサル¹の眼底を観察し、そのうち2頭について眼球切片を作成した。大型の家系を利用して、全個体から抽出したDNAについて連鎖解析及び5つの候補となる遺伝子についてスクリーニングを行った。加齢性の疾患個体については加齢カニクイザル278頭(平均年

齢17歳)の眼底観察を行い、約10%の疾患個体について眼球切片を作成した。免疫染色はアミロイドβ関連分子、酸化関連分子、及び補体関連分子について行った。ドルーゼンに含まれるタンパク質組成を調べるために、マニピレーターによって網膜下からドルーゼンを吸出し、トリプシンによる消化後、2次元LC-MS/MSによるプロテオーム解析を行った。網膜から脈絡膜層の組織抽出液を2D-PAGEで展開し、そのプロットに対して疾患及び健常個体から得られた血清を反応させ、自己抗体分子の探索を行った。

【結果】

網膜切片の免疫染色について若年性及び加齢性の疾患個体のドルーゼンはapolipoprotein E、amyloid P component、complement component C5、the terminal C5b-9 complement complex、vitronectin、membrane cofactor proteinの抗体について陽性反応を示した。また、質量分析計によるプロテオーム解析の結果、60種類のタンパク質を同定し、その中にはヒトのドルーゼンで発見された補体関連分子の他にannexins、crystallins、immunoglobulinsなどが確認された。自己抗原の探索の結果、疾患個体の血清にはAnnexin IIやμ-crystallinに対する自己抗体が優位に増加していることが明らかになった。両タンパク質は網膜下に存在する網膜色素上皮細胞で発現するタンパク質であることが明らかにされた。

【考察】

加齢黄斑変性に対する現在の治療法の多くは病態末期に現れる脈絡膜層から網膜への血管新生の抑制を目的としている。しかしながらこの治療法では病気

の進行を止めるだけで、視力の回復が得られない場合が多い。今回の実験によって病気の初期に観察されるドルーゼンについてその組成を免疫染色及びプロテオーム解析によって調べた結果、補体の活性化が確認された。加齢性の疾患個体ではAnnexinやCrystallinに対する自己個体が優位に増加しており、古典経路による補体の活性化の可能性もある。今後2種類の霊長類モデルを用いて発症機序における補体の関与と補体活性化の抑制による予防法の開発が予定されている。加齢黄斑変性は加齢性の疾患であることから予防に費やす時間が十分にあり、早期診断を含め、網膜・脈絡膜における今後の補体研究が注目される。

[参考文献]

- 1) Evans JR, Prog Ret Eye Res 20:227-253 (2001)
- 2) Allikmets R et al, Science 277:1805-1807 (1997)
- 3) Sudha K et al, Am J Hum Genet 74:20-39 (2004)
- 4) Goncalo R et al, Am J Hum Genet 74:482-494 (2004)
- 5) Hageman GS et al, FASEB J 13:477-484 (1999)
- 6) Mullins RF et al, FASEB J 14:835-846 (2000)
- 7) Anderson DH et al, Am J Ophthalmol 134:411-431 (2002)
- 8) Crabb JW et al, Proc Natl Acad Sci U S A 99:14682-14687 (2002)
- 9) Klein RJ et al, Science 308:385-389 (2005)
- 10) Haines JH et al, Science 308:419-421 (2005)
- 11) Edwards AO et al, Science 308:421-424 (2005)
- 12) Hageman GS et al, PNAS 102:7227-7232 (2005)
- 13) Zarepari S et al, Am J Hum Genet 77:149-153 (2005)
- 14) Okamoto et al, Mol Vis 12:156-158 (2006)
- 15) Gotoh et al, Hum Genet (in press 2006)
- 16) Gold B et al, Nat Genet 38:458-462 (2006)
- 17) Suzuki MT et al, Primates 44:291-294 (2003)
- 18) Umeda S et al, Exp Anim 52:129-135 (2003)
- 19) Umeda S et al, Invest Ophthalmol Vis Sci. 46:683-691 (2005)
- 20) Umeda S et al, FASEB J 19:1683-1685 (2005)

臨床検査における補体成分C3, C4測定値と基準範囲の標準化

池田 勝義、小島 俊哉、早原 千恵、芹川 理恵子、藤井 久美子、大田 俊行
産業医科大学 臨床検査・輸血部

Standardization of C3 and C4 measurement in clinical laboratory testing
Katsuyoshi Ikeda, Toshiya Kojima, Chie Hayahara, Rieko Serikawa,
Kumiko Fujii, Toshiyuki Ota

Laboratory and Transfusion Medicine, University of Occupational and Environmental Health, Japan

【はじめに】

血清中の補体成分のうちC3およびC4は臨床検査として汎用される検査項目であり、自己免疫疾患やアレルギー疾患の診断や経過観察に使用されている。測定方法は免疫比濁法やネフェロメトリー法を用いた自動分析法が普及しており、短時間での測定が可能となってきたので、診察前検査も実施されている。しかし、測定試薬や測定機器ごとに、測定値に差があることが指摘されており、医療施設間において直接測定値が比較できないなどの問題点が発生している。医療機関におけるITの充実や、地域における医療連携を推進させるためには、検査データなどの医療情報の標準化は必須の要件であり、社会的な責務も大きい。そこで今回、九州地区の医療機関におけるC3およびC4の測定値および基準範囲の状況について調査をおこない、標準化に関する方策について考察をおこなった。

【方法】

自施設でC3およびC4を測定している九州地区の医療機関46施設を対象に調査をおこなった。新鮮ヒト血清から作製した2濃度のプール血清(試料A, B)を精度管理試料として凍結状態で各施設に配布し、通常患者血清測定と同じ条件で測定した。併せて、各施設における測定機器・試薬と基準範囲についてアンケート調査をおこなった。

【結果】

各施設での測定値は試料AのC3は平均値131mg/dl、標準偏差5.5mg/dlであり、C4は平均値30.3mg/dl、標準偏差1.7mg/dlであった。試料BのC3は平均値140mg/dl、標準偏差5.7mg/dlであり、C4では平均値32.5mg/dl、標準偏差1.8mg/dlであった。アンケート調査によって得られた各施設におけるC3の基準範囲下限値は40~91mg/dl、基準範囲上限値は100~180mg/dlと大きな施設間差を認めた。一方、C4でも基準範囲下限値は10~20mg/dlであり、基準範囲上限値は31~51mg/dlと施設間差

がみられた。測定機器および測定試薬に関する解析は当日報告するが、全体的な誤差の傾向は系統誤差が主体であった。

【考察】

臨床検査室におけるC3およびC4の測定値は以前大きな施設間差が認められたが、現在は大きな差がないことが確認された。しかし、今回の精度管理試料がいずれも基準値内の数値を示す試料であり、低補体試料や高補体試料によるサーベアーを今後おこなう必要があると考える。一方、基準範囲の設定は各施設で大きな開きが観察され、測定値と比べて大きな施設間差が存在していた。基準範囲がこのように施設によって大きく異なることは問題であり、国際標準品CRM470をもちいて正確度が保証された状況で求めた基準範囲について再検討する必要がある。

【参考文献】

- 1) 九州精度管理研究会 平成17年 報告書
- 2) 血清蛋白13項目の日本成人基準範囲:臨床病理 臨時増刊 特集101号, 克誠堂1996.

コイ補体C1q A, B, C鎖のcDNAのクローニング

杣本 智軌、Vo Kha Tam、加藤 陽子、中尾 実樹
九州大学大学院農学研究院

Molecular cloning of C1q A, B and C chains from common carp

Tomonori Somamoto, Vo Kha Tam, Yoko Kato, Miki Nakao

Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan

【目的】

補体第一成分(C1)の垂成分C1qは、A鎖、B鎖、C鎖のポリペプチドにより構成され、補体古典経路において免疫グロブリンを認識する役割を担う。古典経路の活性化経路は系統発生的に最も新しく、その活性は免疫グロブリンなどの獲得免疫機構を備えている有顎脊椎動物でのみで確認されているが、その進化については未だ不明な点が多い。硬骨魚類においては、コイ、ニジマスからC1の垂成分C1r、C1s様遺伝子の配列が既に明らかにされている^{1,2}。また、円口類であるカワヤツメにおいて、C1q様分子が発見され³、獲得免疫系が存在する以前からC1q分子が存在することが示唆されている。これらのことから、硬骨魚類でもC1q分子が存在することが予想されるが、その遺伝子配列は未だ明らかにされていない。そこで、本研究では、硬骨魚類がA、B、Cの3鎖から構成されるC1qを有するかを明らかにするため、コイからC1qA、B、C鎖のcDNAのクローニングを行い、さらにゼブラフィッシュのゲノムデータベースを利用して、硬骨魚類におけるC1qの進化について考察する。

【方法】

哺乳類のC1qA、B、C鎖と相同なコイ科魚類のESTクローンの配列を基に特異プライマー及び縮重プライマーを設計した。それらのプライマーを用いて、5'及び3'-RACE法にてコイC1qのアミノ酸をコードする領域の塩基配列を決定した。また、鰓、心臓、肝臓、頭腎、体腎、脾臓、腸管、皮膚、抹消血白血球からRNAを採取し、RT-PCRによってコイC1qの発現組織を調べた。さらに、得られたコイC1qの塩基配列を基にゼブラフィッシュのゲノムデータベースからゼブラフィッシュC1q遺伝子の配列を推測した。

【結果】

コイC1qA、B、C鎖は、それぞれ、246、242、244残基の推定アミノ酸からなり、N末端にコラーゲン様領域を、C末端に球状ドメインを含んでいた。哺乳類のC1qA、B、C鎖との相同性は、それぞれ、34.1、

34.0、41.9%であった。また、コイC1qは、肝臓よりもむしろ脾臓、腎臓、腸管、末梢血白血球で強く発現していた。さらに、ゲノムデータベース解析からコイや哺乳類のC1qと相同な3種類のゼブラフィッシュの遺伝子が得られ、それらは同一染色体上でクラスターを形成していた。近隣結合法による分子系統樹では、コイとゼブラフィッシュのC1qA、B、C鎖はそれぞれ、哺乳類のC1qA、B、C鎖群に分類された。

【考察】

コイ、ゼブラフィッシュから3種類のC1q遺伝子が見つかったこと、それらはゲノム上でクラスターを形成していることから、硬骨魚類のC1q分子は哺乳類と同様にA、B、C鎖のポリペプチドにより構成されることが推察される。また、白血球で発現していることから、硬骨魚類でも哺乳類と同様にマクロファージ、単球がC1qを産生している可能性が考えられる。

【参考文献】

- 1) Nakao M et al., Immunogenetics 52: 255 (2001)
- 2) Wang T et al., Immunogenetics 55: 615 (2003)
- 3) Matsushita M et al., Proc Natl Acad Sci U S A 101: 10127(2004)

二胚葉刺胞動物ネマトステラ (*Nematostella vectensis*) の原始補体系

木村 鮎子、坂口 絵里、野中 勝

東京大学大学院理学系研究科・生物科学専攻

Primitive complement system of a bilaterian cnidaria, *Nematostella vectensis*

Ayuko Kimura, Eri Sakaguchi and Masaru Nonaka

Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, The University of Tokyo

【はじめに】

哺乳類補体系は、約30種の因子から構成され高度に組織化されたシステムであるが、その原型は新口動物の出現と同時期に既に確立していたと考えられている。さらに近年、刺胞動物サンゴ・イソギンチャクから中心成分C3の遺伝子が見つかり、節足動物カブトガニからはC3とB因子遺伝子が見つかったことから、少なくともC3の起源はさらに旧口・新口動物の分岐以前までさかのぼること、またB因子についても、まだ二胚葉動物では報告されていないもの、おそらくはC3と同時期に出現していた可能性が示された。¹⁾

本研究では、最近公表された二胚葉刺胞動物ネマトステラ (*Nematostella vectensis*) のドラフトゲノム配列より哺乳類の各補体遺伝子オーソログの検索を行った。¹⁾ また、その結果得られたC3・B因子遺伝子に相同な部分配列を元にこれらの遺伝子のクローニングを試みた。

【方法】

1. ネマトステラドラフトゲノム配列の検索

ネマトステラのドラフトゲノム配列データベース²⁾ (Stellabase: <http://www.stellabase.org/>) に登録された、Genscanで予測されたペプチド配列に対し、ヒト各補体因子のアミノ酸配列をqueryとしてBlast P検索を行った。補体遺伝子であるかどうかの判定は、相同性のE-valueが十分低いこと、あるいは補体因子特有のドメイン構造を持つことを基準とした。

2. ネマトステラC3・B因子遺伝子のクローニング

Blast P検索でヒットしたC3相同配列2種およびB因子相同配列1種と、他動物のC3・B因子アミノ酸配列とをそれぞれアライメントして比較し、種を超えて保存されたアミノ酸配列に相当するプライマーを複数組作成した。これらを用いて、ISOGEN (Nippon gene) を用いて精製したネマトステラtotal RNAを鋳型としてRT-PCRを行い、得られたPCR産物をそのままあるいはクローニングして塩基配列を決定した。現在、これらの配列断片をつなげさらに5'-および3'-RACEを

行い、遺伝子の全長配列の決定を進めている。

【結果・考察】

1. ネマトステラドラフトゲノムの検索

ネマトステラドラフトゲノム配列よりC3・B因子に相同性をもつ配列が得られたが、補体後期成分やMBLなどの他の補体遺伝子に有意な相同性をもつ配列は見つからなかった。また、特徴的なドメイン構造をもたない、各種補体制御因子およびC3レセプターを構成するインテグリン分子にヒットする配列も見つかったが、他の非補体遺伝子と区別できるだけの有意な相同性はなかった。MASPについては、特徴的なドメイン構造の前半部分(CUB/EGF/CUBドメイン)あるいは後半部分(CCP/セリンプロテアーゼドメイン)のみと相同性を持つ配列がそれぞれ見つかったが、これらが連続し、ひとつなぎの遺伝子をコードしている可能性は低いと考えられた。

ゆえに、ネマトステラは補体成分のうちC3とB因子のみを保有する可能性の高いことが示された。

2. ネマトステラC3・B因子遺伝子のクローニング

RT-PCRの結果、C3遺伝子配列2種およびB因子遺伝子配列1種を得て、これらの遺伝子がゲノム中にコードされているだけでなく実際に発現していることを明らかにした。また、得られたC3配列には異物との結合に必要な分子内チオエステル領域などが、B因子配列には特徴的なドメイン構造とセリンプロテアーゼ活性に直接関与するアミノ酸残基がそれぞれ保存されており、これらが実際に補体因子としての活性をもつ可能性が高いことを、一次構造上から確認することができた。これらの配列とドラフトゲノム配列から予測されたアミノ酸配列との一致率は～80%程度と低く、ゲノム配列解読、遺伝子予測の誤り、あるいは補体遺伝子の多型に起因するものと思われた。

【結論】

刺胞動物ネマトステラのドラフトゲノム配列からC3、B因子遺伝子を見出し、RT-PCRによりこれらの発現および活性化に必要なアミノ酸残基やドメイン構造の

保存を確認した。刺胞動物に他の補体遺伝子が存在する可能性は現段階で否定しきれないものの、著しく低いと考えられる。ゆえに、二胚葉動物の分岐以降、旧口・新口動物の系統の分岐以前に出現した原始補体系は、B因子によって限定加水分解を受けたC3が非自己分子を共有結合により標識するだけの、哺乳類の補体系活性増幅経路に類似した非常にシンプルな反応系であったことが示唆された。

[参考文献]

- 1) Nonaka, M and Kimura, A. *Immunogenetics in press*, (2006)
- 2) Sullivan, J.C., et al. *Nucleic Acids Res*, 34 (Database issue): D495-9 (2006)

Staphylococcus aureus のオプソニン化における MASP の役割

岩城 大輔¹、菅野 和子¹、高橋 実¹、遠藤 雄一¹、松下 操²、藤田 禎三¹
¹福島県立医科大学・医・免疫、CREST、²東海大学・工・生命化学

Roles of mannose binding lectin (MBL)-associated serine proteases (MASPs) in opsonization of *Staphylococcus aureus*

Daisuke Iwaki¹, Kazuko Kanno¹, Minoru Takahashi¹, Yuichi Endo¹, Misao Matsushita², Teizo Fujita¹
¹Department of Immunology, Fukushima Medical University and CREST, Japan Science and Technology Agency

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

【はじめに】

補体レクチン経路は、mannose-binding lectin (MBL) および ficolin が病原体表面の糖鎖を認識して活性化される。MBL および ficolin は、3種類の MBL-associated serine protease (MASP-1、MASP-2、MASP-3) と small MBL-associated protein (sMAP) と複合体を形成している。レクチン経路活性化の際に、MASP-1 は C3 を直接活性化し、MASP-2 は C4 と C2 を活性化する¹⁾。活性化された C4 と C2 は C3 転換酵素 (C4b2a) を形成する。これまでに私たちは、MASP の生体防御における役割を明確にするために 3 タイプの MASP 欠損マウス (MASP-1/3 KO、sMAP/MASP-2 KO、all MASPs KO マウス) を作成した。本研究では、*Staphylococcus aureus* のオプソニン化における MASP の役割を明らかにする目的で、MASP 欠損マウスの解析をおこなった。

【方法】

1) *S. aureus* をマウス血清とインキュベーションした後、細菌への C3 沈着を抗 C3 抗体を用いた FACS 解析により測定した。
 2) マウス血清によりオプソニン化された FITC 標識 *S. aureus* をマウス腹腔マクロファージとインキュベーション後、マクロファージ内に取り込まれた細菌を FACS 解析により測定し、各血清のオプソニン活性を検討した。

【結果】

1) *S. aureus* への C3 沈着は、1 分間のインキュベーションで正常血清がプラトーに達するのに対して、KO 血清はいずれも低位であった。sMAP/MASP-2 KO と MASP-1/3 KO 血清は、それぞれ、5 分間、30 分間のインキュベーションにより正常マウスと同程度の沈着が見られたが、all MASPs KO 血清による C3 沈着

は 30 分間インキュベーション後も正常血清より低かった。

2) *S. aureus* を血清で 5 分間オプソニン化したとき、MASP-1/3 KO と all MASPs KO のファゴサイトーシスレベルは低く、非オプソニン化の場合と同程度だった。30 分間オプソニン化したとき、MASP-1/3 KO のファゴサイトーシスレベルは、正常血清と同程度まで上昇したが、all MASPs KO は、正常血清の約 60% であった。

【考察】

以上の結果から、MASP-1 と MASP-2 はともに *S. aureus* の C3 オプソニン化に関与していると考えられるが、とくに MASP-1 は細菌感染のごく初期の C3 活性化において重要な役割を果たしていると考えられる。

【参考文献】

1) Matsushita M. et al. J.Immunol.165: 2637 (2000)

MBL-associated serine protease (MASP)-1 は MASP-2 の活性化を促進する

高橋 実、岩城 大輔、遠藤 雄一、藤田 禎三
福島県立医科大学医学部免疫学講座

MBL-associated serine protease (MASP)-1 can accelerate the activation of MASP-2.

Minoru Takahashi, Daisuke Iwaki, Yuichi Endo, Teizo Fujita

Department of Immunology, Fukushima Medical University School of Medicine, Fukushima, Japan

【はじめに】

レクチン経路において異物膜表面に存在する糖鎖にその認識分子であるマンノース結合レクチン (MBL) や ficolin が結合する。次に認識分子に結合しているセリンプロテアーゼ (MASP-1, 2 and 3) により補体を活性化する一連の反応が起こる¹。MASP の活性化には昨年の本シンポジウムで報告したように C4 および C2 を介する MASP-2 ルートと C4 を介さない MASP-1 ルートの 2 つの存在が確認された。また MASP-1 が直接 C3 を分解する活性はすでに報告されており²、MASP-1 ルートでは MASP-1 が C3 を直接分解していると考えられる。さらに MASP-1 と MASP-3 を両方欠損したマウス (MASP1/3KO) の血清においてマンナンに対する C4 分子の沈着活性が有意に低下していることから MASP-1 ルートは MASP-2 ルートの活性化にも関与していることが示唆された。今回、MASP-1 が MASP-2 の活性化に直接働いている可能性に関して検討を加えたので報告する。

【方法】

- 1) マウスは C57BL/6 との交配で得られた MASP1/3KO、C4 欠損マウス (C4KO) を用いた。
- 2) リコンビナント MASP-1 (rMASP-1) は 6XHis タグを付加し、バキュロウイルスの発現系を用いて、感染させた Sf21 細胞の培養上清からニッケルカラムを用いて精製した。変異型 MASP-2 (rMASP-2i) は活性中心のセリンをアラニンに置換し、文献³に示すように発現、精製を行った。
- 3) Mannan-agarose にマウス血清を加えて、補体を活性化させ、そこに沈着する成分の解析を Western blotting や CBB 染色で行った。

【結果】

Mannan-agarose とマウス血清を反応させると MBL-MASP 複合体が結合する。野生型のマウスではそこに活性型の MASP-2 が確認できるのに対して MASP1/3KO では MASP-2 は未活性型のままであった。MASP1/3KO に rMASP-1 を加えて再構築を行

うと MASP-2 の活性化が認められた。このことは MASP-1 が MASP-2 の活性化にも働くことを示唆した。さらに rMASP-1 と自己活性化を起こさない変異型 rMASP-2i を混ぜて 37 度で反応を行うと、rMASP-2i が重鎖と軽鎖との間で切れることが確認された。このことは MASP-1 が直接 MASP-2 を活性化しうることを明らかにした。

【考察】

レクチン経路の活性化は C3 転換酵素 C4b2a を形成する MASP-2 による経路 (MASP-2 ルート) と MASP-1 による C4 を介さない経路 (MASP-1 ルート) の 2 つのルートが存在する。MASP-1 が欠損すると MASP-2 の活性化も影響されることから、MASP-1 は MASP-2 の活性を調節しているものと考えられる。さらに本研究によって MASP-2 はセリンプロテアーゼである MASP-1 の直接の基質となりえることを初めて示唆された。

【参考文献】

- 1) Fujita, T., *Nature Rev. Immunol.* 2: 346 (2002)
- 2) Matsushita, M. et al., *Immunobiology* 194: 443 (1992)
- 3) Iwaki, D. et al., *J. Endotoxin Res.* 11 : 47 (2005)

血清型フィコリンは補体レクチン経路を介して生体防御に働く

遠藤 雄一¹、中澤 なおみ¹、菅野 和子¹、Yu Liu¹、岩城 大輔¹、高橋 実¹、
松下 操²、藤田 禎三¹

¹福島県立医大・医・免疫、CREST、²東海大・工・生命化学

Serum-type ficolin plays a role in host defense through the lectin pathway.

Yuichi Endo¹, Naomi Nakazawa¹, Kazuko Kanno¹, Yu Liu¹, Daisuke Iwaki¹, Minoru Takahashi¹,
Misao Matsushita², Teizo Fujita¹

¹Dept. of Immunology, Fukushima Medical University School of Medicine and CREST,
Japan Science and Technology Agency

²Dept. of Applied Biochemistry and Institute of Glycotechnology, Tokai University

【はじめに】

自然免疫における自己と非自己の識別は、細菌やウイルスの表面の特異的な分子パターンを認識することによる。フィコリン (Ficolin) は、コラーゲン様およびフィブリノーゲン様ドメインからなるタンパク質であり、マンノース結合レクチン (MBL) と同様に、パターン認識に働くと考えられている。フィコリンおよび MBL はその糖鎖結合活性によって非自己を認識し、引き続きセリンプロテアーゼ MASP の活性化と補体の活性化を誘導して異物を排除する (補体レクチン経路)¹⁻³。フィコリンファミリーの機能については、*in vitro* での検討から、MBL と同様に初期の感染防御に関与すると推定されているが、その真の生理的役割は依然不明である。マウスでは2種類のフィコリンが知られており、フィコリン A はヒト L-フィコリン (血清型) に、フィコリン B はヒト M-フィコリン (非血清型) に相同である⁴。我々は昨年の本シンポジウムにおいて、フィコリン A 欠損マウスの作成と表現型について報告したが⁵、今回はその機構を中心に検討した。

【方法】

- 1) レクチン経路による補体活性化能は、GlcNAC をコートしたマイクロプレート上の C4 沈着活性で測定した。フィコリン A/MASP/sMAP 複合体は GlcNAC-アガロースからの溶出液をウェスタンブロットで検出した。
- 2) マウス血液中での *S. aureus* の増殖速度は、反応後の菌数を LB 培地でのコロニー数で計測した。この際、共存する MBL の効果を除くために、マウス血液をマンナンアガロースに通し MBL を除去した。また、組換えフィコリン A を加え、*S. aureus* の増殖速度に対する効果が回復するかどうか調べた。
- 3) *S. aureus* の増殖抑制の機構を明らかにするため

に、フィコリンによる *S. aureus* の凝集を沈降法により、マクロファージによる *S. aureus* の貪食を FACS により測定した。

【結果】

昨年報告したように、フィコリン A 欠損マウスの表現型の解析と組換えフィコリンによる再構成の結果、以下の点が明らかになった。(1) フィコリン A 欠損マウス (ホモマウス) 血清のレクチン経路は、MBL/MASP/sMAP を介するレクチン経路は正常であるが、フィコリン A/MASP/sMAP を介するレクチン経路を欠損していた。(2) フィコリン A 欠損マウス血清に組換えフィコリン A を添加することにより、フィコリン A/MASP/sMAP 複合体が構築され、補体活性化 (C4 沈着活性) の回復がみられた。この組換えフィコリンを用いた再構成の結果は、組換えフィコリン A と組換え MASP-2 および sMAP との複合体形成および複合体の補体活性化により確認された⁶。(3) 組換えフィコリン A は *S. aureus* に結合し、その結合は GlcNAC で部分的に阻害された。フィコリン A 欠損マウス血液に *S. aureus* を添加し、その増殖速度を調べた結果、ヘテロマウス、野生型マウス血液と比較し増殖抑制効果が低下していた。今回、さらに以下の点を明らかにした。(4) *S. aureus* の増殖に及ぼすフィコリン A 欠損マウス血液の増殖抑制効果は、組換えフィコリン A の添加により回復した。(5) 組換えフィコリン A および B を用いた比較解析の結果、フィコリン B は重合度が低く、MASP/sMAP との結合が弱いものの、*S. aureus* に対する凝集作用が強く、この結果マクロファージによる貪食を増強することが示唆された。

【考察】

これらの結果は、フィコリン A 欠損マウスでは、フィコリン A を認識分子とするレクチン経路が欠損しており、

このレクチン経路の部分的な低下によって、血清のC4沈着活性の有意な低下やS.aureusの増殖抑制効果の低下が生じたと考えられた。S.aureusの増殖抑制は、まずフィコリンAがS.aureusを認識し、これに伴って複合体を形成しているMASPが補体系を活性化し、活性化された補体がバクテリアをオプソニン化する結果、マクロファージによる食細胞が誘導されると考えられた。すなわち、フィコリンAは補体レクチン経路を介して細菌の認識と排除に働くことが示唆された。一方、フィコリンBの作用機序については、その組換えタンパクの解析から、強い凝集活性によって補体系の関与なしに働くと推定された。以上、血清型フィコリンであるフィコリンAは、補体レクチン経路の認識分子として自然免疫の生体防御において重要な役割を担っていることが示された。

[参考文献]

- 1) Matsushita M. et al., J Immunol, 164:2281 (2000).
- 2) Matsushita M. et al., J Immunol, 168:3502 (2002).
- 3) Liu Y. et al., J Immunol 175:3150 (2005).
- 4) Endo Y. et al., Genomics 84:737 (2004).
- 5) 遠藤雄一他、第42回補体シンポジウム抄録 p23 (2005).
- 6) Endo Y. et al., Immunogenet 57:837 (2005).

癌から分泌される低分子物質による自然免疫応答増強メカニズム (1)

藪 政彦¹、志馬 寛明¹、松本 美佐子²、瀬谷 司²、井上 徳光¹

¹大阪府立成人病センター研究所・分子遺伝学部門、²北海道大学大学院医学研究科・感染症制御学分野

Augmentation mechanism of innate immune responses by cancer cells-secreted small molecule (1)

Masahiko Yabu¹, Hiroaki Shime¹, Misako Matsumoto², Tsukasa Seya², Norimitsu Inoue¹

¹Department of Molecular Genetics, Osaka Medical Center for Cancer, ²Department of Microbiology and Immunology, Graduate School of Medicine, Hokkaido University

【はじめに】

健常人あるいは肺癌患者由来の末梢血細胞を Toll-like receptor2/4 のリガンドである *bacillus calmette-guerin-cell wall skeleton* (BCG-CWS) にて刺激すると、健常人に比べ癌患者では IL-12/23 共通サブユニット p40 分泌量が高く、肺癌組織の切除後で正常化することが報告されている。この現象は、癌が単球に働き、TLR 刺激に対する反応性を増強していると考えられる。我々は、癌細胞の培養上清が免疫応答に及ぼす影響を解析し、癌細胞の培養上清が、TLR を介した自然免疫応答を増強することを見出した。さらに、TLR シグナル下流 IL-23 p19 遺伝子近傍に、癌細胞が分泌する低分子物質からのシグナルに 応答する領域が存在することを明らかにしたので報告する。

【方法】

末梢血に肺癌細胞株の培養上清を作用させ、TLR リガンドを加え、IL-12/23 p40 サブユニット、IL-23 p19 サブユニットの発現量をリアルタイム RT-PCR で測定した。

マウスマクロファージ由来細胞株 J774.1 又は RAW264 において、ヒト IL-23p19 遺伝子の 5' 上流領域を用いたルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイ系を構築した。また、肺癌細胞株の培養上清を高 分子量画分と低分子量画分とに分画し、各画分の TLR リガンド刺激に対する影響を調べた。

【結果】

健常人末梢血から単離した単球を TLR リガンドで 刺激すると、p40、p19 の発現が誘導される。この時に、 培養上清の高分子量画分を添加しておくとも p40 の 発現量が、低分子量画分では p19 の発現量が、BCG- CWS 又は PG 単独刺激に比べて増大した。p40 の 発現量増大には GM-CSF が、p19 には非タンパク性の 低分子物質が関わっていた。

次に、レポーター遺伝子アッセイによって、低分子物

質からのシグナルは、TLR シグナル下流の主な転写 因子 NF κ B の活性化を増強せず、p19 の UTR を含 む 5' 上流領域、2.67kbp に働くことがわかった。この 現象は J774.1 細胞株で見られたが、RAW264 細胞 株は TLR リガンド刺激に対して応答を示す一方で、培 養上清による増強効果は見られなかった。

【考察】

本研究では、癌細胞から分泌される低分子物質の シグナルに 応答し、TLR シグナル増強に働く DNA エ レメントを含む領域を見出した。今後は、J774.1 と RAW264 の各細胞株間で見られた 応答性の違いや、 今回構築したアッセイ系を用いてこの領域を狭めるこ とによって、我々が同定した増強因子からのシグナル に 応答する DNA エレメントを明らかにし、自然免疫 応答の増強に働く分子メカニズムを解析していきたい。

癌から分泌される低分子物質による自然免疫応答増強メカニズム (2)

志馬 寛明¹、藪 政彦¹、松本 美佐子²、瀬谷 司²、井上 徳光¹

¹大阪府立成人病センター研究所・分子遺伝学部門、²北海道大学大学院医学研究科・感染症制御学分野

Augmentation mechanism of innate immune responses by cancer cells-secreted small molecule (2)

Hiroaki Shime¹, Masahiko Yabu¹, Misako Matsumoto², Tsukasa Seya², Norimitsu Inoue¹

¹Department of Molecular Genetics, Osaka Medical Center for Cancer, ²Department of Microbiology and Immunology, Graduate School of Medicine, Hokkaido University

【はじめに】

癌患者では、しばしば免疫機能に異常がみられ、それが癌の進展や易感染性に関与すると考えられている。免疫機構は癌細胞を非自己と認識し、排除しようとするが、それに対して癌細胞は様々な方法で回避することも知られている。その一つは、免疫機能を調節する因子の分泌である。我々は、癌細胞の培養上清を研究対象とし、自然免疫応答に与える影響を解析してきた。その過程で、癌細胞の培養上清は、自然免疫応答を増強することを見出した。本研究では、癌細胞が産生する免疫調節因子を新たに同定し、その作用を解析したので報告する。

【方法】

肺癌細胞株の培養上清を分画し、低分子量画分(分子量10,000以下)を得た。その画分を単球に添加し、TLRリガンドで刺激した後、サイトカイン遺伝子のmRNA量と培養上清中へのサイトカイン分泌量を測定した。また、マクロファージ由来細胞株を用いてIL-23p19遺伝子の5'上流領域を用いたルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイ系を構築した。

【結果】

健常人末梢血から単離した単球をペプチドグリカンで刺激すると、IL-23を構成するサブユニットp19の発現が誘導されるが、肺癌細胞株培養上清の低分子量画分を添加しておくと、添加しない場合に比べてp19遺伝子の発現量が増大した。この現象は、p19遺伝子の5'上流領域を用いたレポーター遺伝子アッセイ系でも見られたことから、増強因子はp19遺伝子の転写を促進することが示唆された。また、ヒトだけでなくマウス由来細胞においても同様の現象がみられた。

次に、様々な解析結果をもとに、候補となる増強因子を推定した。その候補物質は、実際に癌細胞の培養上清中に存在し、その標準品は培養上清中と同じ濃度で増強活性を示した。また、候補物質の生合成阻害剤を癌細胞株に作用させると、培養上清の活性は消

失した。同定した増強因子は、BCG-CWSやLPS等によって誘導されるp19遺伝子の発現も増強し、IL-23の分泌量も増加させた。さらに、増強因子は、TLRリガンドでマウス脾細胞を刺激したときIL-23の産生を介して誘導されるT細胞からのIL-17産生を著しく増強することが分かった。

【考察】

本研究では、癌細胞から分泌される低分子物質を免疫応答の調節因子の一つとして新たに同定した。その増強因子の存在下では、TLRリガンド刺激によるマウス脾細胞からのIL-17産生量も増大した。癌組織における免疫応答の増強は癌の除去に効果的に働くことが予想されるが、癌組織に浸潤した免疫担当細胞から産生されるサイトカインは、血管新生を誘導するなど癌細胞の増殖に促進的に働くことも知られている。今後は、本研究で同定した増強因子の作用機構および腫瘍免疫応答における役割を明らかにしていきたい。

抗がん免疫エフェクター起動における樹状細胞 Toll-like receptor の役割

瀬谷 司

北大・医・感染制御 (seya-tu@med.hokudai.ac.jp)

Role of Toll-like receptors in inducing antitumor effecters

Tsukasa Seya

Dept. Microbiol. Immunol., Graduate School of Med., Hokkaido University

【目的】

がんは遺伝子病で必然的に自己由来の抗原を内在する。抗原の性質がエフェクター (CTL, NKT, NK など) 誘導性であればそのがんは免疫能を上げることにより予防、予後改善が期待できる。がん免疫療法の潮流は「自然免疫」の再発見によって本質的な見直しが発見に行われている。抗がん免疫起動において自然免疫が獲得免疫に先行して活性化する必要がある。がんの場合、感染なしに抗原のみを投与するとしばしばアナジーに陥ることから、自然免疫 (TLR- 樹状細胞) の先行起動が重要との仮説が提示されている。がん抗原など外来抗原はTLR刺激とともに取り込まれて始めてcross-priming が起き、アナジーを脱する。TLR- 樹状細胞の免疫活性化における分子細胞生物学的な機能解析はしかし未明である。本研究の主旨はCTL誘導に関与するTLR活性化分子 (アジュバントと総称される) の機能解析を通じて、樹状細胞にCTLを誘導する指向性を与えるアジュバントを開発することである。

【研究成果】

TLR agonists はそれぞれマウス移植がん (B16 melanoma) の系でCTL誘導を惹起する。このメカニズムをTLRとアダプターのKOマウスを用いて解析した。BCG-cell-wall skeleton (CWS) によるTLR2/4刺激はMyD88アダプター経路を選択的に活性化し、CTLを誘導した。MyD88 KO マウスで抗がんCTLは誘導されなかった。一方、polyI:CによるTLR3刺激はTICAM-1 (TRIF) アダプター経路を活性化し、CTLを誘導した。TICAM-1 KO マウスで抗がんCTLは誘導されなかった。この結果と樹状細胞の刺激実験から、CTL誘導に必要な樹状細胞cross-primingには上記2つ以上 (複数) のTLR経路が関与することが判明した。ヒト樹状細胞を用いたGenechip解析の結果ではBCG-CWSはTLR2/4経路を介してBCG-inducible genes (約260) を誘導した。一方、polyI:CはTLR3経路を介してIFN-inducible

genes (約140) を誘導した。両者は異なったクラスターを形成した。故にBCG-CWS, polyI:Cは樹状細胞アジュバントとして免疫活性化を促進するが、アジュバントごとに異なったエフェクター活性化を誘導する。言い換えるとアジュバントの選択は樹状細胞の指向性を変え、抗がん免疫のエフェクター誘導能を修飾する。これらの分子機構の相違などを検討中である。

NK 活性化に必要なアジュバントの機能と性質

瀬谷 司

北大・医・感染制御 (seya-tu@med.hokudai.ac.jp)

Role of Toll-like receptors in inducing antitumor effecters

Tsukasa Seya

Dept. Microbiol. Immunol., Graduate School of Med., Hokkaido University

[目的]

がんの CTL 回避機構は MHC class I を発現抑制することである。Class I を欠くがん細胞は一方 NK の標的になる。CTL, NK を両方活性化できればがんの MHC の動態に拘らずがん細胞を排除できるはずである。樹状細胞に NK, CTL を誘導する指向性を与える Toll-like receptor (TLR) 活性化分子 (アジュバント) を探索した。RNA 誘導体が CTL, NK の活性化能を付与する樹状細胞応答を誘起することが判明した。

[結果]

成果を要約する。1. TLR3 と TICAM-1 の KO マウスを用いて CTL 誘導に必要な樹状細胞 cross-priming に polyI:C 依存性の TLR3 経路が関与することを示した。2. PolyI:C 依存性の cross-priming は外来のペプチド抗原を樹状細胞が提示するのに必要である。3. NK 活性化は TICAM-1 経路によって誘導されるが、MyD88 経路では誘導されない。TICAM-1 が下流分子として NAP1 を選択した場合、IKK ϵ /TBK1 を介して IRF-3 を活性化し NK 活性化が起きる。PolyI:C はマウス腹腔内投与で用いるが、ヒトには有害である。毒性の低い RNA 誘導体をスクリーニング中である。

Toll-like receptor homolog RP105 のコラーゲン関節炎における作用

多田 芳史¹、小荒田 秀一¹、大田 明英²、長澤 浩平¹
佐賀大学医学部膠原病・リウマチ内科¹、看護学科²

Role of the Toll-like receptor homolog RP105 in the development of collagen-induced arthritis
Yoshifumi Tada¹, Syuichi Koarada¹, Akihide Ohta², Kohei Nagasawa¹
Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine¹ and Department of Nursing²,
Saga University, Saga, Japan

【はじめに】

Toll-like receptor (TLR) は種々の微生物由来の分子のレセプターであり、その活性化は自然免疫および獲得免疫の誘導に重要な役割をはたしている。RP105 はB 細胞、樹状細胞 (DC)、マクロファージに発現する TLR 関連分子である¹。細胞外には TLR に共通の leucine-rich repeat を有するが、細胞内には通常の TLR と異なり Toll-IL-1 receptor ドメインをもたない。当初 B 細胞の活性化分子として報告されたが、その後 TLR4 とともに LPS の結合に関与することが示された²。今回、RP105 分子のマウスコラーゲン関節炎における作用について検討した。

【方法】

RP105 欠損マウス (RP^{-/-}) を DBA/1 マウスに戻し交配し、II 型コラーゲン (CII) で免疫して関節炎を誘導した。抗 CII 抗体価は ELISA で測定した。脾細胞を CII で刺激し上清中のサイトカインを測定した。脾 DC を MACS beads で採取し、LPS で刺激して TNF- α の産生を検討した。

【結果】

最終的な発症率には差がなかったが、RP^{-/-} マウスではより早期から関節炎を発症した。関節炎スコアは RP^{-/-} マウスで有意に高値だった。血清抗コラーゲン抗体価には有意な差を認めなかった。関節炎の誘導時に CFA に代えて IFA を使用しても同様の結果が得られた。しかしモノクローナル抗 CII 抗体と LPS で誘導すると関節炎はコントロールと同程度であった。脾細胞の CII 刺激に対する IFN- γ や TNF- α の産生は RP^{-/-} マウスで亢進していた。脾 DC とリンパ節細胞を混合して刺激すると RP^{-/-} DC において IFN- γ 産生がより増加した。LPS 刺激による脾 DC の TNF- α 産生は RP^{-/-} DC において軽度の増加が見られた。

【考察】

RP105 は T 細胞には発現しておらず、RP^{-/-} マウスでは DC などの抗原提示細胞の機能の亢進があり、そ

の結果 T 細胞の IFN- γ 産生の増強や関節炎の促進が生じると考えられた。

【結論】

RP105 はコラーゲン関節炎の発症に抑制的に作用する。

【参考文献】

- 1) Miyake K. et al. J. Immunol. 154: 3333 (1995)
- 2) Ogata H, et al. J. Exp. Med. 192: 23 (2000)

遺伝性 GPI アンカー欠損症

木下 タロウ¹、村上 良子¹、前田 裕輔¹、Antonio Almeida²、Anastasios Karadimitris²

¹大阪大学微生物病研究所 免疫不全

² Department of Haematology, Imperial College London, Hammersmith Hospital, UK

Inherited GPI deficiency

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

² Department of Haematology, Imperial College London, Hammersmith Hospital, UK

【はじめに】

GPIはタンパク質を細胞膜にアンカーする糖脂質でその基本骨格はすべての真核細胞において保存されている。現在までに100種以上のGPIアンカー型蛋白が知られており、その機能は酵素、接着因子、レセプター、補体制御因子などさまざまである。GPI欠損症として知られている夜間発作性血色素尿症(PNH)は、造血幹細胞のPIG-A遺伝子に体細胞突然変異がおり血球細胞においてのみGPIアンカー型蛋白の発現が欠損する後天的な疾患である¹。PIG-AはGPI生合成の最初のステップに必須の蛋白で、PIG-Aノックアウトマウスは全身でGPIアンカー型蛋白が発現しないために胎生致死となる。

今回我々はイギリスのグループとの共同研究により、主症状として深部静脈血栓症と欠神発作を呈し、劣性遺伝形式を持つGPIアンカー欠損症の2家系を解析したので報告する²。

【方法および結果】

1. 全く関係のない2家系から、いとこ結婚により計3人の患児が出生した。門脈の血栓症と欠神発作を共通症状としてもつが、他に発達の異常はみとめられなかった。
2. 末梢血、および線維芽細胞のFACS解析によりGPIアンカー型蛋白の発現の低下がみとめられ、その程度は細胞種により異なっていた。赤血球系ではCD59, DAFの発現低下は軽微で、また非血球細胞である線維芽細胞においてもCD59の発現低下がみられ、このことはPNHと全く異なる疾患であることを示す。
3. 患者由来のB細胞株の脂質解析により、GPI生合成の1つめのマンノース転移に異常があることがわかったので、この反応を担う蛋白PIG-Mを発現するプラスミドを導入したところ細胞表面のGPIアンカー型蛋白の発現が戻った。すなわち原因遺伝子はPIG-Mであることがわかった。
4. 患者由来の細胞ではPIG-Mのプロモーター部位

のGCboxの点変異がみられた。EMSAおよびレポーターによるプロモーター活性の解析により、この部分に結合するSp1の結合が点変異により阻害された結果遺伝子の発現が激減していることがわかった。

5. ChIP解析によりこの部分のヒストンアセチル化が減少していること事がわかったので、患者由来のB細胞株をHDAC(histone deacetylase)阻害薬であるNa butyrateで処理するとPIG-Mの発現が戻った。

【考察】

本来GPIの完全欠損は胎生致死であり、PIG-MはGPI生合成に必須の遺伝子である。患者はプロモーター部位の異常によってbasalな発現は激減しているが、胎生期の発達はほぼ正常である。このことはPIG-Mがさまざまな転写因子によって発現の制御を受けていることを示す。また患者の主症状である血栓症とけいれん発作にどのようなGPIアンカー型蛋白が関係しているのか明らかにしたい。

【参考文献】

- 1) Takeda J., et al., Cell 73: 703 (1993)
- 2) Almeida A., et al., Nature Med. (in press)

GPI イノシトール脱アシル酵素欠損マウスは雄性不妊を示す

植田 康敬^{1,3}、前田 裕輔¹、山口 亮²、伊川 正人²、岡部 勝²、木下 タロウ¹

¹大阪大学微生物病研究所 免疫不全

²大阪大学微生物病研究所付属 遺伝情報実験センター

³大阪大学大学院医学系研究科分子病態内科学講座

GPI inositol deacylase deficient mouse

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

² Genome Research Center, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

²Department of Hematology and Oncology, Osaka University Graduate School of Medicine

【はじめに】

GPIアンカー型蛋白質の生合成において、GPIイノシトールのパルミチン酸は除去される。我々はこの除去を行うアシル除去酵素PGAP1(Post GPI-attachment to Proteins1)を同定した¹⁾。培養細胞での実験でPGAP1欠損細胞は、GPIアンカー型蛋白質の細胞表面への発現に異常は見られなかったが、GPIアンカー型蛋白質の細胞表面への輸送に遅れが見られた。GPIイノシトールのアシル除去の生物学的な意義を解析するために、我々はPGAP1ノックアウトマウスを作成した。

【方法および結果】

1. 酵素活性に重要なセリンを含む、PGAP1の5番目のエクソンを欠損させるように設計したベクターをマウスES細胞に注入し、キメラマウスを作成した。交配後ヘテロマウスをPCRによりゲノタイプスクリーニングし、ヘテロ同士を交配させることでホモのノックアウトマウスを得た。
2. ホモのノックアウトマウスのほとんど(9割以上)は周産期致死を示した。
3. 周産期致死を示したノックアウトマウスの半分以上は顔面、口顎の形成異常を示していた。
4. 生き残ったホモのノックアウトマウスは、同腹の野生型、ヘテロと比し成長の遅延を認めた。
5. 雄のホモノックアウトマウスを雌と交配させても子供が生まれなかった。
6. 雄のノックアウトマウスと野生型の雌を交配させた直後に、雌の子宮・輸卵管をホルマリン固定して観察した。ノックアウトの精子は子宮から輸卵管に進行できていなかった。
7. ノックアウトの精子は野生型の卵の透明帯への付着が著しく悪かった。
8. ノックアウトの精子にはADAM2、ADAM3、

Izumo、CD52、CD59bなどの、正常な受精に必要な蛋白質は発現していた。

【考察】

PGAP1は個体の正常な発生に重要な役割を果たしていた。また、受精のメカニズムにおける脱アシル化の役割については現在究明中である。

【参考文献】

- 1) Tanaka S, et al., J Biol Chem. 2004 Apr 2;279(14):14256-63.

同種リコンビナントCD46免疫による、自己抗CD46抗体産生ラットモデルと不妊への影響について

水野 正司^{1,2}、Claire L. Harris¹、B. Paul Morgan¹、松尾 清一²

¹カーディフ大学医学部医学生化学&免疫学講座、²名古屋大学大学院大学腎臓内科学講座

Immunization with CD46 generates a strong autoantibody response targeting the spermatozoal acrosome in rat.

Masashi Mizuno^{1,2}, Claire L. Harris¹, B. Paul Morgan¹, Seiichi Matsuo²

¹Complement Biology Group, Medical Biochemistry & Immunology, School of Medicine Cardiff University, Cardiff, UK; ²Dev. of Clinical Immunology, Dept. of Nephrology, Internal Medicine, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan

【はじめに】

CD46は、C3レベルで働く膜補体制御因子(CReg)の一つである。一方で、ヒトおよびrodentにおいて、精子のアクロゾームに集中して存在していることが報告されており、生殖器系への密接な関与が示唆されている。実際、CD46を抑制することで、受精が阻害されること、ないしは促進されることの両面が、現在までに報告されている¹⁻³。

一方で、ヒト不妊症の一部として、自己免疫疾患に分類される抗精子自己抗体産生があげられる。CD46の特異的分布によりCD46がそのターゲットになっているかどうか、は興味深いところである。

これまでに、我々は、ラットCD46が非常に特異的に後期spermatogenic cellと精子アクロゾームに特異的に存在していることを報告した^{4,5}。今回、我々は、雌雄ラットにおいて、自己に対する抗CD46抗体産生の可能性の有無、そして体内産生させた抗CD46抗体の不妊への関連を検討した。

【方法】

1. リコンビナント・ラットCD46(rCD46)を抗原として、雌雄ラット(各6匹)に免疫し、自己抗体モデルのひとつとして、同種抗CD46抗体の体内産生の誘導を試みた。抗体産生の有無には、可溶化ラット精巣から精製した、native rat CD46をSDS-PAGEで展開し、Western blottingを行った。抗体の力価は、ELISAにて評価した。

2. 抗CD46産生雌ラットとコントロール雌ラットをそれぞれ、untreated雄ラットとmatingを行い、妊娠の有無、胎児の数を検討した。

3. 抗CD46産生雄ラットとコントロール雄ラットをそれぞれ、untreated雌ラットとmatingを行い、妊娠の有無と胎児の数を検討した。また、各雄ラットの精巣と

精子の免疫組織学的評価を合わせて行った。

【結果】

1. rCD46を免疫したすべての雌雄ラットに抗CD46抗体を血清中に認めた。

2. 抗CD46産生雌ラットとコントロール雌ラットの間、妊娠の有無の差は見られず、胎児数の数にも有意差は認められなかった。

3. 抗CD46産生雄ラットとコントロール雄ラットの間、妊娠の有無の差は見られず、胎児数の数にも有意差は認められなかった。抗CD46産生雄ラットの精巣上皮に、明らかなIgG(抗CD46)の沈着は認められなかったが、採取した約5%の精子のアクロゾーム部位に一致してIgG(抗CD46)の結合が観察された。

【考案】

雌ラットにはCD46は存在しないため、同種抗CD46産生が容易に行われることは想像しやすいが、CD46を発現する雄についてもほぼ同様に抗CD46産生が生じることが観察された。これは、雄のCD46の発現部位が、blood testis barrier内部の精巣上皮のみであり、CD46の存在しない雌ラットと状況を異にしないため、抗体産生の雌雄間の差は認められなかったものと思われる。しかし、一旦産生された自己抗体であっても、そのみでは、germ cellへの影響は認められず、妊娠の成立について明らかな影響は観察されなかった。これは、産生された抗CD46が、妊娠成立に有意な影響を与えないのか、または、産生抗体量の影響、抗体の結合部位の影響、生体内での抗体のCD46へのアクセスの影響等で十分にCD46への影響が見られていない可能性が考えられる。

【参考文献】

1) Taylor CT. et al., Hum Reproduct 9:907 (1994)

- 2) D' Cruz OJ. Et al., Am J Reprod Immunol
37:172(1997)
- 3) Inoue N. et al., Mol Cell Biol 23 :2614
(2003)
- 4) Mizuno M. et al., Biol Reprod 71 :1374
(2004)
- 5) Mizuno M. et al., Biol Reprod 72 :908
(2005)

補体 C5a リセプターを介したアポトーシス増幅および抑制機構

西浦 弘志、山本 哲郎

熊本大学大学院医学薬学研究部分子病理分野

Mechanism of acceleration and protection to apoptosis through C5a receptor

Hiroshi Nishiura, Tetsuro Yamamoto

Dept. of Mol. Pathol., Faculty of Med. and Pharm. Sci., Kumamoto University, Kumamoto, Japan

【はじめに】

リボソーム蛋白 S19 (RP S19) 二量体が、補体 C5a リセプター (C5aR) を介してアポトーシスを増幅する事を、マウス NIH3T3 細胞株を用いたマンガン誘導性アポトーシスの系にて証明した¹。しかし、詳細な機構は不明であった。今回、C5aR を介したアポトーシス増幅が、C5aR 非発現細胞と考えられてきたヒト細胞種においても働く普遍的な現象である事を支持する結果を得たので、その細胞内分子機構と共に報告する。

【方法】

1) 白血病細胞株 HL-60 および上皮系細胞株 AspC-1 に、Heat-shock、Manganese(II) 負荷、および Thapsigargin 投与という3種の異なる方法でアポトーシスを誘導した。C5aR リガンドである C5a および C5aR partial agonist 合成ペプチドによるアポトーシス抑制効果を、Cell cycle analysis により評価した。2) アポトーシス過程における C5aR の発現を、RT-PCR、Western-blotting、および FACS により評価した。3) RP S19 二量体中和抗体のアポトーシス抑制効果を、Cell cycle analysis により評価した。4) RP S19 二量体産生が阻害される HL-60 変異株 (Q137N mutant) を樹立し、アポトーシス進行の程度を、Cell cycle analysis により評価した。5) 三量体 G 蛋白の働きを調節する分子 RGS3 のアポトーシス促進への関与と、PI3-K/Akt および ERK-K 経路の状況について検討した。

【結果】

1) RP S19 二量体によるアポトーシス増幅は、2種の細胞の全てのアポトーシス惹起法において認められた。2) C5aR は、全ての系において、アポトーシス誘導後に de novo 合成された。3) RP S19 二量体産生阻害型変異細胞株は、アポトーシスに対する耐性を獲得した。4) RP S19 二量体は、RGS3 を細胞膜領域に蓄積させた。5) RP S19 二量体は、ERK-K 経路を抑制した。

【考察】

アポトーシス細胞より産生・放出された RP S19 二量体が、アポトーシス過程で発現した C5aR を介して RGS3 を細胞膜領域へ蓄積させる。この RGS3 が、G-protein coupled receptor 依存性の生存シグナル² における三量体 Gi および Gq 依存性の ERK-K 活性化経路を阻害して、細胞膜上からの生存シグナルを阻止する。その結果、シグナルバランスがアポトーシス死シグナルのほうにより強く傾き、アポトーシスの促進が起きると考えられる。C5a は、C5aR との結合において、RP S19 二量体と競合すると共に生存シグナルを発生し、アポトーシスを抑制する。

【参考文献】

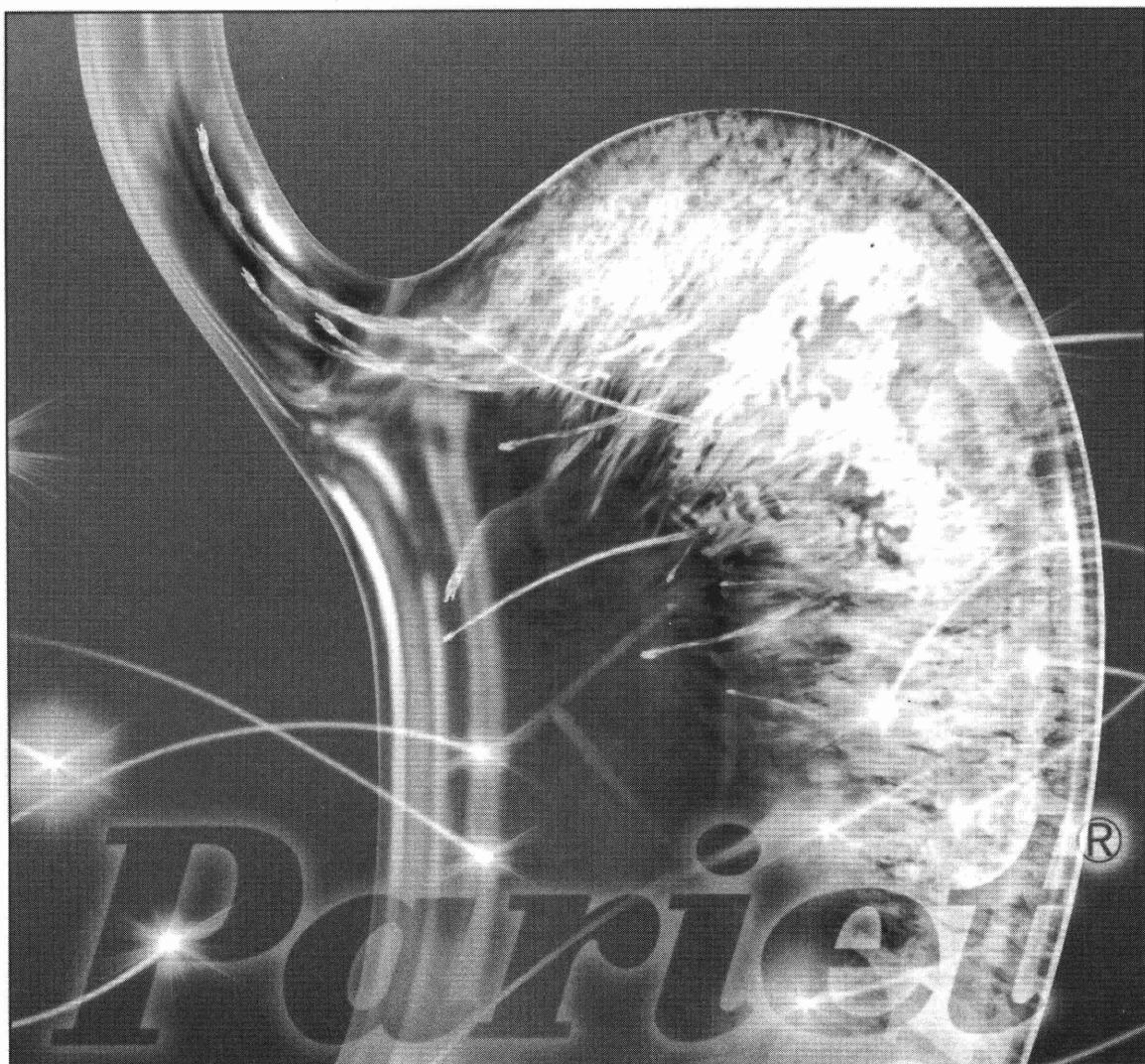
- 1) Nishiura H. et al., J. Cell. Biochem. 94; 540 (2005)
- 2) Graeme M. Mol. Pharm. 64: 1271 (2003)

協 賛 一 覧

(50音順)

アステラス製薬株式会社
アベンティスファーマ株式会社
エーザイ株式会社
化学及血清療法研究所
キョーリン製薬株式会社
キリンビール株式会社
三共株式会社
塩野義製薬株式会社
住友製薬株式会社
相生会ピーエスクリニック
第一製薬株式会社
大日本製薬株式会社
武田薬品工業株式会社
田辺製薬株式会社
中外製薬株式会社
日本イーライリリー株式会社
ノバルティスファーマ株式会社
三菱ウェルファーマ株式会社
宗像医師会病院
ヤマサ醤油株式会社診断薬部

(平成18年7月14日現在)



指定医薬品・処方せん医薬品*
プロトンポンプ阻害剤

[薬価基準収載]

パリエット[®] 錠 10mg
錠 20mg

〈ラベプラゾールナトリウム製剤〉

* 注意—医師等の処方せんにより使用すること

● 効能・効果、用法・用量及び禁忌を含む使用上の注意等については添付文書をご参照ください。

製造販売元

hvc
ヒューマン・ヘルスケア企業



エーザイ株式会社

〒112-8088 東京都文京区小石川4-6-10
<http://www.eisai.co.jp>

商品情報お問い合わせ先：エーザイ株式会社 お客様ホットライン室

☎ 0120-419-497 9～18時(土、日、祝日 9～17時)

PT0504-4 2005年4月作成

Santen



Together

抗リウマチ剤

薬価基準収載

創薬、指定医薬品、処方せん医薬品
(注意—医師等の処方せんにより使用すること)

メトレート錠2mg

Metolate® tablets 2mg

メトトレキサート錠

■【効能・効果】、【用法・用量】、【警告、禁忌を含む使用上の注意】等については、添付文書をご参照下さい。

抗リウマチ剤

薬価基準収載

創薬、指定医薬品、処方せん医薬品
(注意—医師等の処方せんにより使用すること)

リマチル錠100mg

Rimatil® tablets 100mg

ブシラミン100mg錠

創薬、指定医薬品、処方せん医薬品
(注意—医師等の処方せんにより使用すること)

リマチル錠50mg

Rimatil® tablets 50mg

ブシラミン50mg錠

■【効能・効果】、【用法・用量】、【禁忌、原則禁忌を含む使用上の注意】等については、添付文書をご参照下さい。

製造販売元
S 参天製薬株式会社
大阪府東淀川区下新庄3-9-19
資料請求先 医薬事業部 医薬情報室

抗リウマチ剤

薬価基準収載

指定医薬品、処方せん医薬品
(注意—医師等の処方せんにより使用すること)

アザルフィジンEN錠

Azulfidine® EN tablets

サラソスルファピリジン500mg腸溶錠

指定医薬品、処方せん医薬品
(注意—医師等の処方せんにより使用すること)

アザルフィジンEN錠250mg

Azulfidine® EN tablets 250mg

サラソスルファピリジン250mg腸溶錠

■【効能・効果】、【用法・用量】、【禁忌を含む使用上の注意】等については、添付文書をご参照下さい。

発売
S 参天製薬株式会社
大阪府東淀川区下新庄3-9-19
資料請求先 医薬事業部 医薬情報室

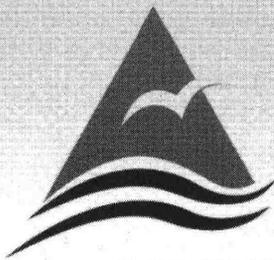
製造販売
Pfizer ファイザー株式会社
東京都渋谷区代々木3-22-7



DAINIPPON
SUMITOMO
PHARMA

Amlodin

さらに、一緒に、歩みたい…



高血圧症・狭心症治療薬/持続性Ca拮抗薬——薬価基準収載
劇薬・指定医薬品・処方せん医薬品(注意—医師等の処方せんにより使用すること)

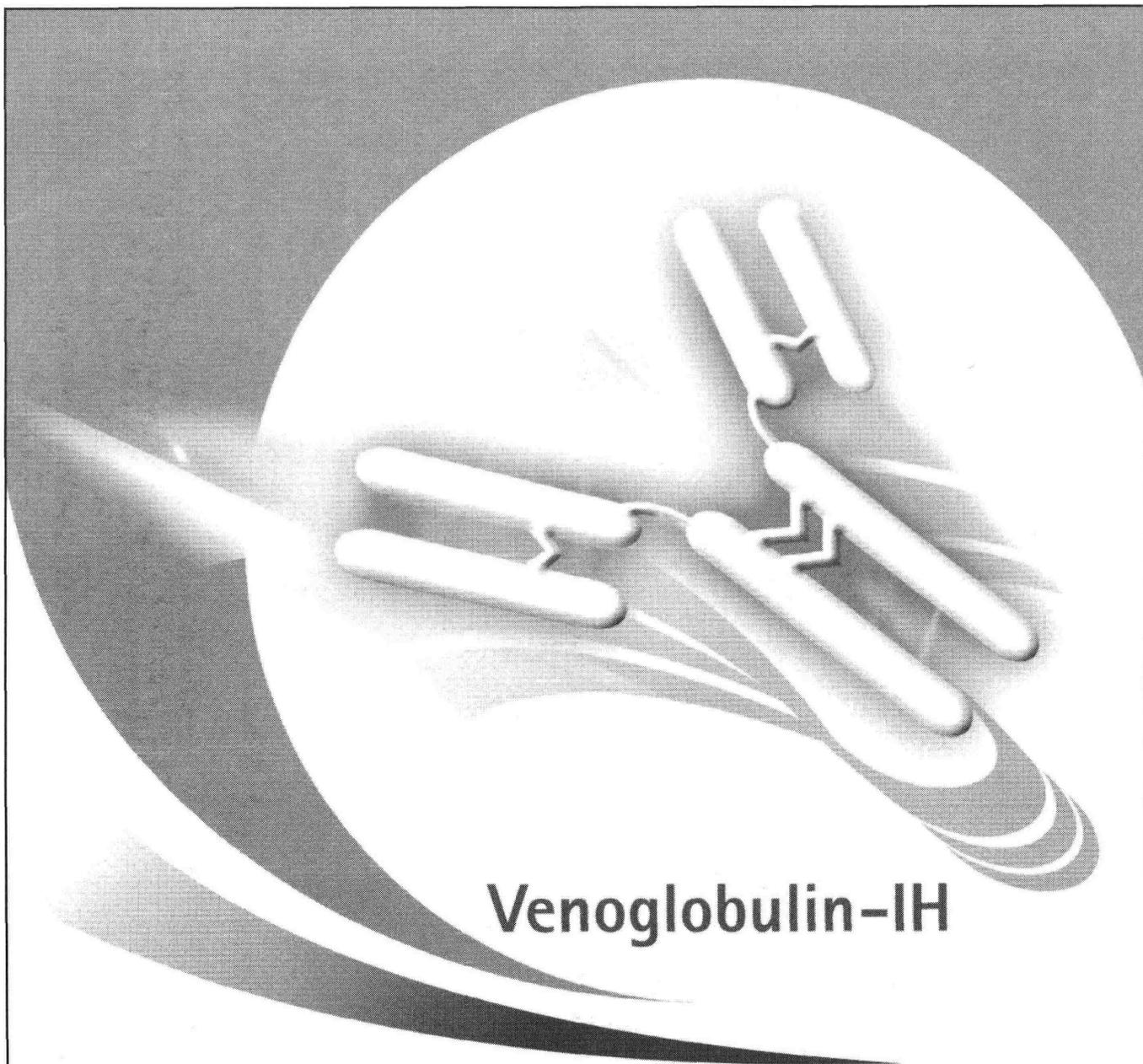
アムロジン[®]錠^{2.5}/₅

Amlodin[®] ベシル酸アムロジピン

■効能・効果、用法・用量、禁忌を含む使用上の注意等につきましては添付文書をご参照ください。

製造販売元(資料請求先)
大日本住友製薬株式会社
〒541-0045 大阪市中央区道修町 2-6-8

〈製品に関するお問い合わせ先〉
くすり相談室
☎0120-03-4389
受付時間/月~金 9:00~17:30(祝・祭日を除く)
<http://med.ds-pharma.co.jp/>



Venoglobulin-IH



Venoglobulin-IH

血漿分画製剤（液状・静注用人免疫グロブリン製剤）

薬価基準収載

献血 ヴェノグロブリン®-IH ヨシトミ

生物学的製剤基準 ポリエチレングリコール処理人免疫グロブリン

指定医薬品、処方せん医薬品^注

Kenketsu Venoglobulin-IH^{YOSHITOMI}

献血

特定生物由来製品

注）注意—医師等の処方せんにより使用すること

※〈禁忌〉〈原則禁忌〉〈効能・効果〉〈用法・用量〉〈使用上の注意〉等の詳細については、
製品添付文書をご参照ください。

製造販売元（資料請求先）
株式会社ベネシス
大阪市中央区平野町2-6-9

発売
三菱ウェルファーマ株式会社
大阪市中央区平野町2-6-9

Wyeth

Leading the Way to
a Healthier World

私たちが歩む道は、
21世紀を健康にする



ワイス株式会社

〒104-0031 東京都中央区京橋1丁目10番3号 <http://www.wyeth.jp>



口腔内速溶錠
レディタブ錠

(錠剤はイメージ)

●効能・効果、用法・用量、禁忌を含む使用上の注意等
につきましては、製品添付文書等をご参照下さい。

指定医薬品 処方せん医薬品 (注意—医師等の処方せんにより使用すること)

持続性選択H₁受容体拮抗・アレルギー性疾患治療剤 薬価基準収載

クラリチン[®]錠 10mg
レディタブ[®]錠 10mg

ロラタジン錠 / ロラタジン口腔内速溶錠

Claritin[®] / Claritin RediTabs[®]



発売元 [資料請求先]

シオノギ製薬

大阪市中央区道修町3-1-8 〒541-0045

電話 0120-956-734 (医薬情報センター)

<http://www.shionogi.co.jp/med/>

製造販売元



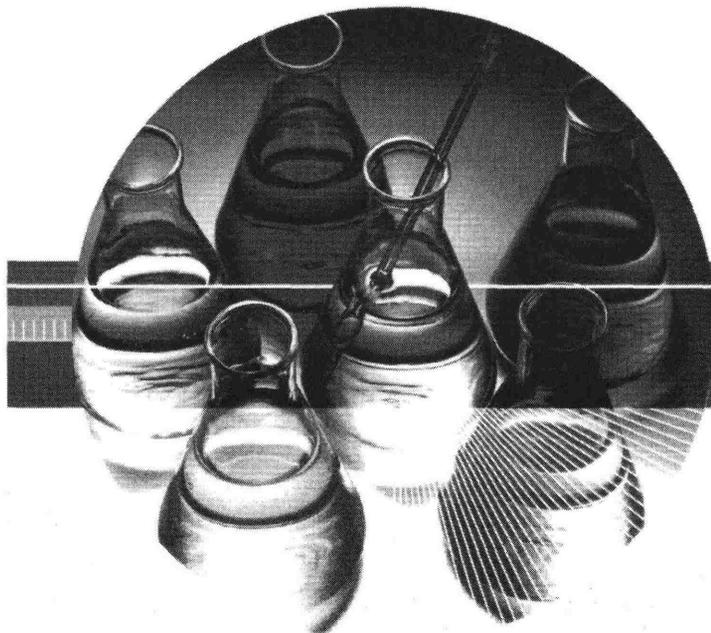
シエリング・プラウ株式会社

〒541-0046 大阪市中央区平野町2-3-7

2005年7月作成A42 (株)登録商標

Think Perfection

お客様にとっての"パーフェクト"をめざして、正晃は常にユーザーの視点で考えています。



ライフサイエンスをはじめとする科学技術は
私たちの生活と未来を大きくリードし続けています。
正晃は、総合試薬ディーラーとして培ったノウハウを
お客様にとっての"パーフェクト"を起点に
多彩な分野へ柔軟な対応で貢献いたします。



正晃株式会社

www.seiconet.co.jp

本社 福岡市東区松島3丁目34番33号 〒813-0062
TEL: 092-621-8199(代) FAX: 092-611-4415

営業所 福岡第一・福岡第二・北九州・久留米・大分
佐賀・山口・下関・熊本・沖縄・宮崎
鹿児島・東京・長崎・広域

事業内容

■基礎研究用試薬
■体外診断用医薬品
■動物用医薬品
■化学工業薬品
上記の販売

■理化学機器
■医療用機器
■分析用機器
■その他機器、器具
上記の販売・修理

■家電製品
■コンピュータおよび
医療関連ソフトウェア
上記の開発・販売



A-IIアンタゴニスト

ニューロタン[®]錠50

(ロサルタンカリウム錠)〈薬価基準収載〉

指定医薬品・処方せん医薬品：注意 — 医師等の処方せんにより使用すること

効能・効果、用法・用量、禁忌を含む使用上の注意等については、製品添付文書をご参照ください。



BANYU
A subsidiary of Merck & Co., Inc.,
Whitehouse Station, N.J., U.S.A.

製造販売元【資料請求先】

万有製薬株式会社

〒102-8667 東京都千代田区九段北1-13-12 北の丸スクエア
ホームページ <http://www.banyu.co.jp/>

©Trademark of Merck & Co., Inc. Whitehouse Station, N.J., U.S.A.
2006年4月作成 04-11CZR06-J-A24J

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) 会員は学術集会において、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) 会長は必要に応じ、運営委員会の承認を得たうえで、自身の任期の範囲内の任意の任期を有する会長補佐を任命することができる。
- (14) 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。
- (15) 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。
- (16) 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。

- (17) 運営委員会の構成員は、運営委員、監事、補体シンポジウム集会長(当期および次期)、会長、および会長補佐とする。
- (18) 運営委員会は、構成員の過半数の出席を要する。
- (19) 運営委員会は、会務の審議、本会の運営に当たる。
- (20) 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。
- (21) 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。
- (22) 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

- (23) 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。
- (24) 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。
- (25) 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

- (26) 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。
- (27) 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。
- (28) 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。
- (29) 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。
- (30) 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

- (31) 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
平成16年8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

補体研究会賛助会員

(50音順)

医学生物学研究所(株)

トーアエイヨー(株)

明治製菓(株)

和光純薬工業(株)

補体研究会

会 長 瀬 谷 司

会長補佐 木 下 夕 口 ウ

運営委員 阿 部 正 義
 井 上 徳 光
 大 井 洋 之
 中 尾 実 樹
 南 学 正 臣
 岡 田 秀 親
 酒 井 好 古
 野 中 勝

監 事 岡 田 則 子
 藤 田 禎 三

事務局長 野 中 勝

集会長 堀 内 孝 彦

次期集会長 松 下 操

