

図7. MICA Tg の眼底変化

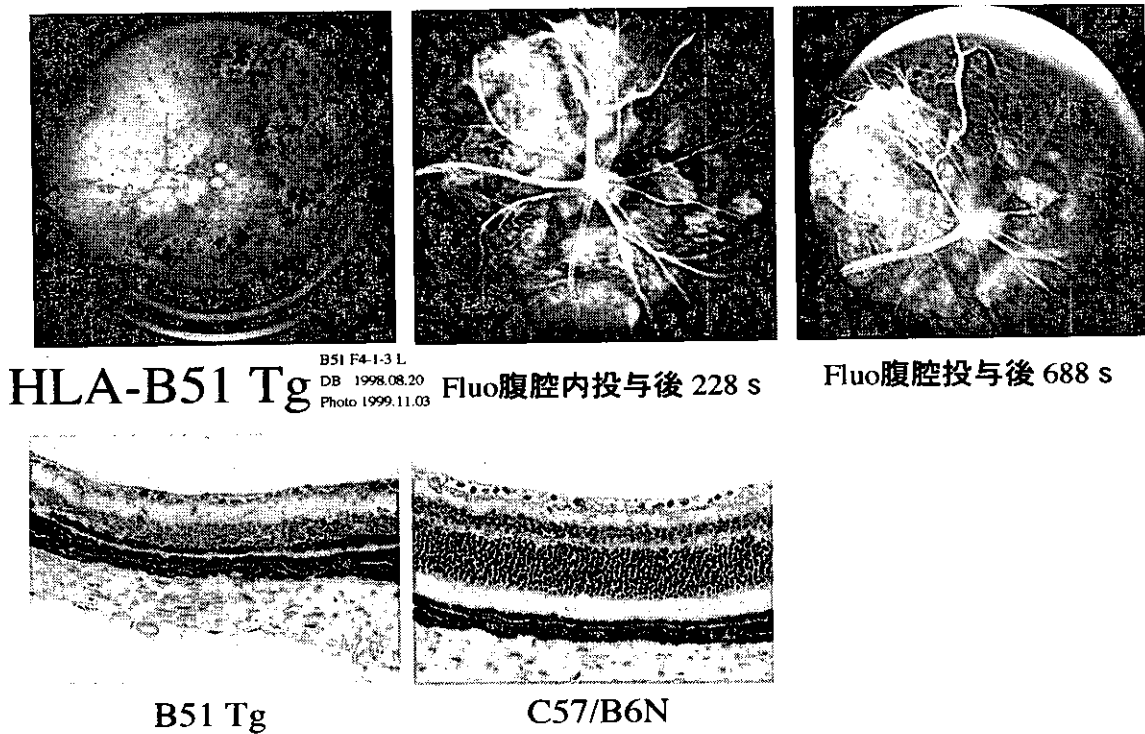


図8. HLA-B51Tg の眼底変化

図7 MICA Tg では脈絡膜の萎縮、色素沈着、血管の白線化が見られた。蛍光眼底造影写真では早期からの脈絡膜過蛍光と血管の狭小化、口径不同がみられた。図8 HLA-B51 Tg ではMICA Tg よりもやや粗造な感じの脈絡膜萎縮と色素沈着が見られた。眼底のH.E染色標本では、視細胞層、外顆粒層の消失、網膜色素上皮の不整がみられた。



図9. MICA Tg 生後1-2週の皮膚角化

みられなかった。

HLA-B51 遺伝子単独の Tg の新規の知見として、網脈絡膜萎縮がみられた。(図8) 生後4日の仔の眼瞼を切開し前眼部を観察したところ炎症所見は認められなかった。生後3週目には検眼鏡的に網膜の黄白色点状変化が一面に見られる。生後5-6週目には網脈絡膜萎縮と色素沈着、血管の狭小化が認められるようになった。フルオロセイン蛍光眼底造影所見としては初期からの網膜色素上皮障害を示唆する脈絡膜過蛍光、網膜動脈、静脈の狭小化、口径不同があった。生後5-6週目の眼球の病理学的所見としては網膜色素上皮の不整、網膜視細胞層の消失、網膜外顆粒層の消失があった。

MICA cDNA が遺伝子導入された NS1 細胞で免疫されたマウスの血清では、Immunoblot法で68-70kDaのタンパク質が確認された。これは糖鎖タンパク質として報告されている分子量にほぼ等しく (Bahram *et al.*, 1996a), 抗ヒトMICA ポリクローナル抗体が作成されたと考えられる。

極性を持った状態で培養できる MDCK 細胞では、PCMV-MICA-GFP を導入した場合は basolateral な部分に、TM 部分を欠落させた PCMV-MICA-del-GFP を導入すると Apical な部分に GFP の蛍光共焦点顕微鏡にて観察した。(図10,11) pCAG-MICA 5.1* を導入した場合は Apical な部分に抗 MICA 抗体は染色された。(図12) ヒトの小腸の上皮においても basolateral な部分に発現がみられることが確認された。(図13)

Phenotype の変化のまとめ

	MICA(A5)	MICA(A6)	MICB	B51	B51 × B ₂ m
• 白血球数	—		増加		
• 赤血球数	減少		—		
• 体高	—		減少		
• 皮膚	体幹脱毛		皮膚角化		
• 網脈絡膜萎縮	あり	なし	なし	あり	あり
• 末梢血好中球 Superoxide産生				亢進*	

*M. Takano, T. Sakane 1995 American College of Rheumatology

表1. Phenotype の変化のまとめ

D. 考察

今回、我々はヒト MICA、MICB 遺伝子を導入したトランスジェニックマウス(Tg)の系統を確立した。MICA, MICB 遺伝子は HLA-B 遺伝子近傍にありベーチェット病との関連が示唆されていた。

MICA の過剰発現はマウスに赤血球減少、脈絡膜萎縮を引き起こした。MICA Tg で見られた網脈絡膜萎縮はベーチェット病の末期像に似ていた。マウス自体が近交系であることから網膜色素変性症のような変性疾患を引き起こしている可能性もある。しかし C57BL/6N (2月令4匹、4月令9匹、19月令1匹)、B6C3F1 (2.5月令5匹)、B6C3F1 × B6C3F1 (7月令8匹) では眼底変化を認めないことより否定的である。また導入遺伝子の挿入場所による変異の可能性は3系統で眼底変化が見られたことから考えにくい。また前眼部の炎症は経過中一度も認めなかった。このような眼底変化が何らかの炎症性変化に引き続いて生じたものなのか、変性疾患のように細胞死としてもたらされたのかは今のところはっきりしない。網膜色素変性症のモデルマウスとして知られる rds マウスや *tulp1*^{-/-} マウスでは生後2週目頃には視細胞層の減少が病理学的に明らかになってくる (Stephanie A. Hagstrom *et al.*, 1999)。今回、MICA マウスの眼底検査は早期のものでも生後約6ヶ月目に行われたものであり、今後は生後早い時期からの経時的な眼球の観察が必要になる。しかし MICA mRNA を高発現するのは子孫がとりにくく今後の課題となっている。また、末梢血中の赤血球の減少は腸管病変による下血による貧血を反映している可能性がある。

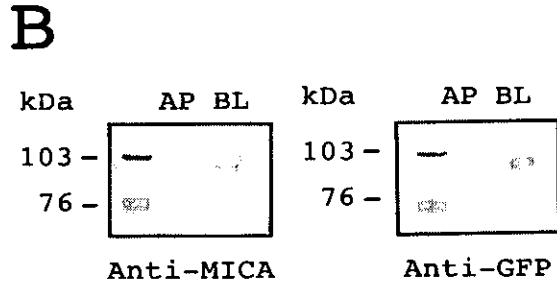
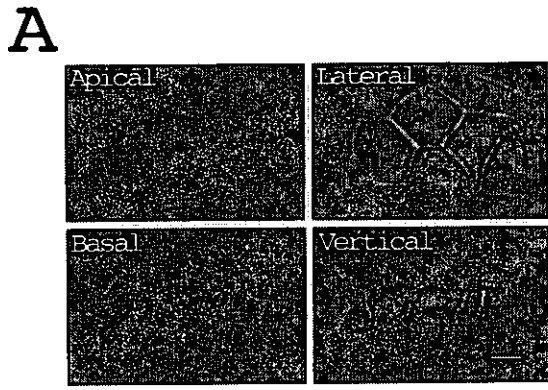


図10. 極性を持ったMDCK細胞におけるGFPを目印にしたMICAの細胞内局在

A. 共焦点蛍光顕微鏡にてApical(左上), lateral(右上)、basal(左下)の像を得た。核染もしてある。右下の図は共焦点画像を垂直方向に再構成したものである。B. domain selective cell surface biotinylation assay 抗MICA, 抗GFP抗体ともにbasolateralに結合した。

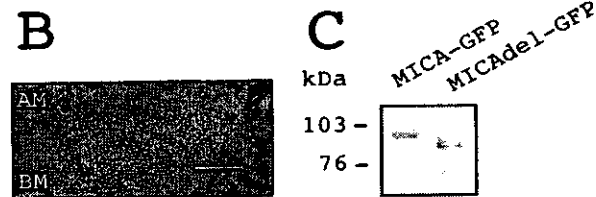
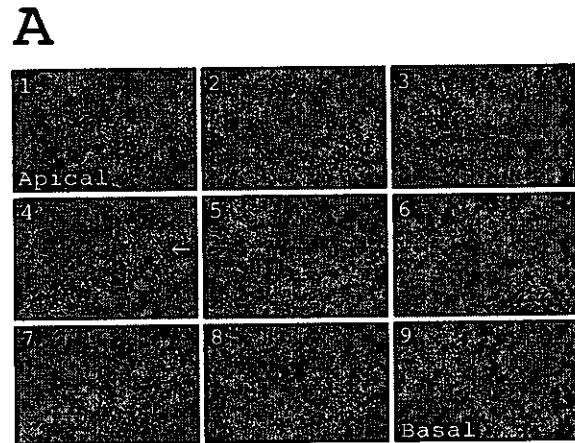


図11. MDCK細胞における変異MICAの発現の細胞内局在

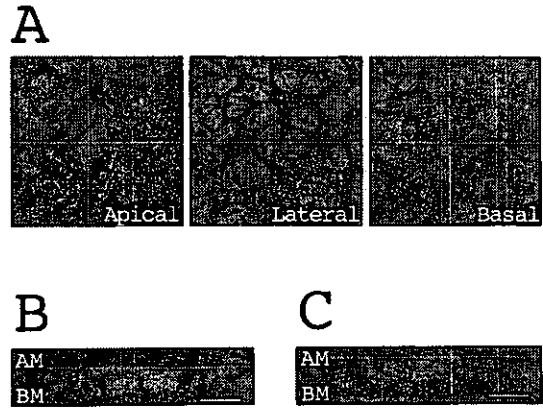


図12 MICA 5.1*のMDCK細胞における細胞内局在

A, B. 一層の細胞のApical側をビオチンでラベルし抗Texas Red結合streptavidinで可視化したものと、抗MICA抗体とFITC結合二次抗体で可視化したもの。Apical側に赤と緑の蛍光が重なって染まって見える。

C 抗MICA抗体とFITC結合二次抗体のみ

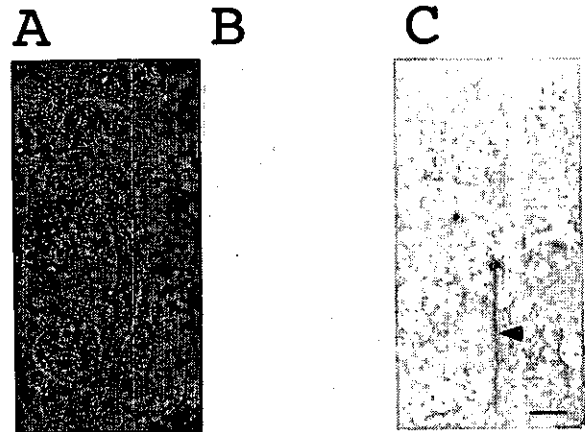


図13. 抗MICAマウス抗体を用いたヒト小腸の蛍光免疫染色と蛍光免疫電顕像

A. ヒト小腸の抗MICAマウス抗体とFITC-抗マウスIgG抗体, 抗アルカリフォスファターゼ抗体とTexas Red結合抗兔IgG抗体による二重染色 B. ヒト小腸の抗MICAマウス抗体とHRP結合抗マウス抗体による染色 C. ヒト小腸の抗MICAマウス抗体とHRP結合抗抗体による電子顕微鏡による超微細構造

今回の結果よりMICBの過剰発現はマウスに低体重、白血球増多、角化異常といった表現系の変化を引き起こす可能性が示唆された。今のところ低体重、白血球増多は3系統で見られているため、外来遺伝子導入に伴う宿主遺伝子への影響によって引き起こされたとは考えにくく、MICBの過剰発現によるものと考えられる。特にMICB発現Tgマウスに見られる白血球数の顕著な増加は注目すべき点と思われる。ベーチェット病の最も特徴的な細胞学的現象の一つは、好中球の炎症組織内への浸潤(aseptic neutrophil infiltration)と考えられている。この好中球は、特にsuperoxide過剰産生好中球としての特徴がある。興味深いことに、ベーチェット病発症に深く関連するとされる遺伝子HLA-B51を導入されたTgマウスでは、FMLP刺激によるsuperoxide過剰産生好中球の数が増加していることが示された(Takeno *et al.*, 1995)。しかし、残念ながらこのマウスでは、ベーチェット病に付随する様々な症状(皮膚の炎症、眼のブドウ膜炎の発症、口腔内アフタ、陰部潰瘍等)は見出されていない(Takeno *et al.*, 1995)。MICB発現Tgマウスに見られた白血球数の顕著な増加は、このsuperoxide過剰産生好中球の数の増加を反映しているのか、今後、詳細な解析が必要である。

皮膚の角化異常については1系統では明確にあらわれ、別の1系統では一部のF1にのみ認められたため、MICBの過剰発現がこの変化を引き起こす責任遺伝子であるかしばらく観察が必要である。角化異常部位の病理学的検索では、角質層の肥厚、表皮層の肥厚が見られた。基底細胞層の分裂速度が何らかの影響で上昇し角化異常症を引き起こしている可能性がある。細胞表面上にMICA、MICBタンパク質を発現した細胞は腸管上皮に存在する $\gamma\delta$ T細胞に認識され細胞障害を受けることが明らかになっている。(Groh *et al.*, 1998) マウス皮膚は $\gamma\delta$ T細胞の豊富に存在する部位でありMICB Tg皮膚でも同様の変化が起こる可能性がある。皮膚角化異常部の免疫組織学的検索が必要となる。抗マウス $\gamma\delta$ T cellによる角化異常部の免疫染色を行ったが、真皮内の炎症細胞が少なく陽性細胞は判定出来なかった。今後皮膚の採材部位及び

時期を検討し再検する必要があると思われる。

HLA-B51 遺伝子単独のTgの新規の知見として、網脈絡膜萎縮がみられた。生後4日の仔の眼瞼を切開し前眼部を観察したところ炎症所見は認められなかった。生後3週目には検眼鏡的に網膜の黄白色点状変化が一面に見られた。これらが炎症性変化によるものなのかについては、現在、経時的な病理学的解析が進行中でありいまのところ結論を得ていない。生後5-6週目の時点での眼底変化はMICA Tgよりも色素沈着が強かった。フルオロセイン蛍光眼底造影所見の初期からの網脈絡膜過蛍光と病理学的所見の網膜色素上皮の不整はよく合致した。

MICAとMICBは、MHCクラスI配列と比較した場合、細胞外ドメインである $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3$ との相同性は27%と極めて低いが、立体構造的にはHLAクラスI抗原と酷似するので、その分子にはペプチド結合部位、T細胞認識部位があると想像される(Bahram *et al.*, 1994)。しかし、HLAクラスI抗原とは異なり、 $\beta 2$ -microglobulinとは結合していないとされる(Bahram *et al.*, 1994)。従って、MICAとMICBは、古典的なMHCクラスI抗原提示の系には関係しないのではないかと予測もある。MICAに対するmonoclonal抗体による免疫組織化学的解析からMICAタンパク質は、小腸上皮にのみ局在することが判明した(Groh *et al.*, 1996)が、これは、MICAが腸上皮細胞内リンパ系におけるT細胞サブセットへのリガンドとして機能する、言い換えれば、特殊なT細胞の免疫監視系において機能することを示唆している。しかも、MICA及びMICBの発現は熱ショック誘導性を示し、MICA及びMICB遺伝子promoter内には、熱ショック応答性elementが存在することから(Groh *et al.*, 1996)、一方では、cell stress response遺伝子の一つではないかとされている。細胞表面上にMICA、MICB蛋白質を発現した細胞は腸管上皮に存在する $\gamma\delta$ T細胞に認識され細胞障害を受けることが明らかになっている。(Groh *et al.* 1998)。今後はTgを用いて上述のようなMICA、MICB遺伝子の機能を確認したい。またリンパ球サブセットの変化や血中の蛋白分画などに影響がないか検討が必要である。

MICA及びMICBの機能は何であるか、今

持ってその実体は明らかでないが、これらタンパク質を過剰発現する Tg マウスを用いることにより、その実体解明にいくらかでも接近出来るのではないかと考えている。特に免疫系への影響の解明には個体を用いた研究が必要となる。そして、その解明の過程の先に、これらのタンパク質とベーチェット病発症との因果関係が明らかにされるものと期待される。

E. 結論

MICA, HLA-B51 遺伝子のマウスにおける過剰発現は脈絡膜萎縮を引き起こした。この性質がベーチェット病の眼病変の発症・進行に関わる可能性が示唆された。

MICA の膜貫通部分の変化は MICA の細胞内での発現部位を変化させた。これによって何らかの生物学的機能が変化し疾患の形成に寄与すると考えられた。ベーチェット病患者では特定の膜貫通部分の構造を持った MICA のアレルが見られるとする説を支持する結果であった。

F. 引用文献

Bahram, S., Bresnahan, M., Geraghty, E., and Spies, T. (1994) A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 6259-6263.

Bahram, S. and Spies, T. (1996) Nucleotide sequence of a human MHC class I MICB cDNA. Immunogenetics 43, 230-233.

Bahram, S., Mizuki, N., Inoko, H., and Spies, T. (1996a) Nucleotide sequence of the human MHC class I MICA gene. Immunogenetics 44, 80-81.

Bahram, S., Shiina, T., Oka, A., Tamiya, G., and Inoko, H. (1996a) Genomic structure of the human MHC class I MICB gene. Immunogenetics 45, 161-162.

Groh, V., Bahram, S., Bauer, S., Herman, A., Beauchamp, M., and Spies, T. (1996) Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 12445-12450.

Groh, V., Steinle A., Bauer S., Spies T., Recognition of

Stress-induced MHC Molecules by Intestinal Epithelial $\gamma \delta$ T Cells. Science, 279. 1737-1740. 1998

Mizuki N., Ando H., Kimura M., Ohno S., MiyataShoji., Yamazaki M., Tashiro H., Watanabe K., Ono A., Taguchi S., Sugawara C., Fukuzumi Y., Okumura K., Gotoh K., Ishihara M., Nakamura M., Yonemoto J., Kikuti Y. Y., Shina T., Chen L., Ando A., Ikemura T., and Inoko H. (1997) Nucleotide Sequence Analysis of the HLA Class I Region Spanning the 237-kb Segment around the HLA-B and -C Gene. GENOMICS 42, 55-66

Miyazaki J., Takaki S., Araki K., Tashiro F., Tominaga A., Takatsu K. and Yamamura K-I. Expression vector system based on the chicken β -actin promoter directs interleukin-5. Gene. 79, 269-277

Mizuki, N., Ota, M., Kimura, M., Ohno, S., Ando, H., Katsuyama, Y., Yamazaki, M., Watanabe, K., Goto, K., Nakamura, S., Bahram, S., and Inoko, H. (1997) Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: A strong association of six GCT repetitions with Behcet's disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 1298-1303.

Stephanie A. Hagstrom, Mabel Duyano, Michael A North, and tiansen Li (1999) Retinal Degeneration in tulp1^{-/-} mice: Accumulation in the interphotoreceptor Matrix. IOVS 40, 2795-2802

Takeno, M., Kariyone, A., Yamashita, N., Takiguchi, M., Mizushima, Y., Haneoka, H., and Sakane, T. (1995) Excessive function of peripheral blood neutrophils from patients with Bechet's disease and from HLA-B51 transgenic mice. Arthritis Rheumat. 38, 426-433.

G. 研究発表

1. 論文発表 Intracellular localization of human MHC class I chain related gene A (MICA) in polarized MDCK cells and human intestinal epithelial cells Hiroshi Suemizu *et al.* (投稿中)

2. 学会発表 ヒト MICA, MICB 遺伝子導入マウスの作製 ○野村英一^{1, 2}, 末水洋志¹, 木村孝博², 佐藤正宏³, 大野重昭², 猪子英俊¹, 木村 穰¹
(¹東海大医, 分子生命², ²横浜市大医, 眼科, ³東海大総医研)、日本分子生物学会1999年年会(福岡)

Streptococcus sanguis 感染ノトバイオームマウスにおける 眼病変の形成と菌体コンポーネントに対する抗体応答

分担研究者

磯貝恵美子	北海道医療大学歯学部口腔衛生学教室
磯貝 浩	札幌医科大学医学部実験動物施設
木村浩一	札幌医科大学医学部微生物学教室
藤井暢弘	札幌医科大学医学部微生物学教室
小竹 聡	北海道大学医学部眼科学教室
吉川浩次	北海道大学医学部眼科学教室
大野重昭	横浜市立大学医学部眼科学教室

研究要旨

ベーチェット病 (BD) において、*Streptococcus sanguis* が外因の候補となりうるかを調べるためノトバイオーム実験動物モデルを作製した。さらに、このマウスで眼病変が形成されるかどうかおよび人の眼と共通抗原性を有するペプチドに対して抗体応答が成立するかどうかを調べた。

S. sanguis はマウスの口腔によく定着した。熱障害群では接種菌数に関係なく唾液 1ml あたりの菌数は 10^{7-8} であった。熱障害対照マウスと比較したとき、粘膜障害は重度で治癒の遅延を示した単独感染群では唾液中の菌数は $1/10-1/100$ と有意にすくなかったが、糞便中の菌数は熱障害群と差がなかった。熱障害群では *S. sanguis* 細胞壁に対する DTH 応答を示したが、単独感染群では応答を示さなかった。眼病変は感染群で虹彩毛様体炎が見られた。病変の程度は軽く、好中球の浸潤を伴っていた。一方、菌を接種しなかったマウスでは眼病変は認められなかった。熱障害群のほうが菌単独感染群に比べて、眼病変を有するマウスの割合は高かった。感染マウスにおいて網膜抗原関連ペプチドに対して抗体応答が成立した。また、熱ショック蛋白合成ペプチドについても、抗体応答が成立した。

A. 研究目的

ベーチェット病 (BD) は再発性の口腔および外囲陰部の潰瘍、ぶどう膜炎を伴う全身の炎症性疾患である。その病因と発病病理機構はいまだ不明とされている。我々は *Streptococcus sanguis* が外因の候補であることを示してきた (3、4、5、7、8、9)。たとえば、口腔細菌叢に占める *S. sanguis* の割合は対照に比較して有意に増加していた (4)。さらに、患者からの分離株は遺伝的、抗原的、生物

学的性状をこれまで報告された標準株と異にしていた (8)。患者病状の活動性のめやすとなる好中球の活性化のレベルは口腔内の *S. sanguis* の増加に相関していた (4)。臨床分離株から得た抗原に対しての患者の免疫応答は抗体応答や皮膚反応などで証明されただけでなく、場合によっては症状の誘発も起こしえた (7、9)。我々は本菌が外因の候補となりうるかを調べるためノトバイオーム実験動物モデルを作製した。さらに、このマウスで眼病変が形成さ

れるかどうかおよび人の眼と共通抗原性を有するペプチドに対して抗体応答が成立するかどうかを調べた。

B. 研究方法

マウスとしては無菌 I Q I マウスをもちい、患者由来菌株として BD113-20 を選択した。マウスの口腔に $10^{3.5,7}$ の菌を接種した。粘膜熱障害の影響をあわせて調べた。合成ペプチドとしては網膜抗原関連ペプチド 4 種および H s p 合成ペプチド 1 種を作成した (表 1)。

C. 研究結果

S. sanguis はマウスの口腔によく定着した。熱障害群では接種菌数に関係なく唾液 1ml あたりの菌数は 10^{7-8} であった。熱障害対照マウスと比較したとき、粘膜障害は重度で治癒の遅延を示した。5 匹中 1 例、消化管潰瘍での死亡を認めた。単独感染群では唾液中の菌数は $1/10 - 1/100$ と有意にすくなかったが、糞便中の菌数は熱障害群と差がなかった。熱障害群では *S. sanguis* 細胞壁に対する D T H 応答を示したが、単独感染群では応答を示さなかった。眼病変は感染群で虹彩毛様体炎が見られた [図 1]。病変の程度は軽く、好中球の浸潤を伴っていた。一方、菌を接種しなかったマウスでは眼病変は認められなかった。熱障害群のほうが菌単独感染群に比べて、眼病変を有するマウスの割合は高かった。感染マウスにおいて 4 種のうち特に 2 種の網膜抗原関連ペプチドに対してそれぞれ抗体応答が成立した [図 2]。また、熱ショック蛋白合成ペプチドについても、抗体応

答が成立した [図 3]。抗体価は未感染対照マウスと比較したとき、有意に高かった。

D. 考察

本菌は口腔常在菌のひとつであることから、菌数の増加、それにとまなう免疫あるいは炎症応答は単に本病に付随した結果の反映にすぎないとの指摘もある。Koch の 4 原則のうち、基準 3 および 4 に次のようなことが記載されている。分離された菌は、あらためて別の個体に問題の疾患を発生させることができる。そして実験的に起こされた疾患個体に対象となる菌が、再び発見されなければならない。*S. sanguis* 感染説の最大の弱点はまさにこの点がクリアされていないことである。このモデルは微生物をいっさい持たない無菌マウスに *S. sanguis* を感染させたものである。感染は容易に成立し、局所だけでなく全身への免疫応答誘導の証明ができた。特に、H S P や網膜抗原ペプチドに対する抗体誘導が起こり、これが病変形成と密接に関連することがわかった。さらに、本病のもっとも重要な症状である眼病変について虹彩毛様体炎を証明できた。今回、用いた抗原ペプチドは単にマウスでの実験に留まらず、人での診断に応用できる可能性を見出した。患者血清に対して、高い反応性を示す 95 k D 蛋白の一部をコードしている B e s - 1 は網膜抗原をコードしている遺伝子と高い相同性を有している (10)。熱ショック蛋白についても人と細菌間での分子相同性と病態形成への関与が示唆されてきた (11,12)。H s p は様々の自己免疫疾患の発病病理に関与することが示されてきた [図 4]。実際、H s p 特異的な抗体産生や T 細胞応答、さらに病変部位に H s p の過剰発現が

認められている。しかし、Hspのみではそれぞれの疾病の特性を説明できない。また、種々の細菌でもヒトHspと高いホモロジーを持つ領域があり、発病病理に関与するとされている〔図5〕。少なくとも、これら細菌の一群は慢性持続感染あるいは遅発感染の様相を呈することがある。ベーチェット病とのなんらかの共通点、相違点を明確にし、比重論的にHspの病態への関与を明らかにする必要がある。今回のマウスの実験系において、これらのペプチドによる免疫応答は細菌の防御にまわらず、宿主への攻撃因子となりうることが示唆された。

E. 結論

S. sanguis を無菌マウスに定着させることによって、BDと類似の病変を誘導できた。これらマウスでは網膜抗原関連ペプチドおよびHspに対して抗体応答が成立した。同様にBD患者でも網膜抗原関連ペプチドおよびHspに対して高い抗体価を示していた〔未発表データ〕。

引用文献

1. Chidgey, A. and Boyd, R. 1997. *Int. Immunol.* 9: 1527-1536.
2. Isogai, E., et al. 1998. *Infect. Immun.* 66: 197-202.
3. Isogai, E., et al. 1991. *Arch. Oral Biol.* 36: 425-429.
4. Isogai, E., et al. 1990. *Arch. Oral Biol.* 35: 43-48.
5. Isogai, E., et al. 1990. *Bifidobacteria Microflora* 9: 27-41.
6. Goodnow, C. C. 1996. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 93: 2264-2271.
7. The Behcet's Disease Research Committee of Japan. 1989. *J. Rheumatol.* 16:506-511
8. Yokota, K., et al. 1995. *Microbiol. Immunol.* 39: 729-732.
9. Yokota, K., et al. 1992. *Microbiol. Immunol.* 36: 815-822.
10. Yoshikawa, et al. 1998. *Zentbl. Bakteriologie* 287, 449-460
11. Kaneko, S. et al. 1997. *Clin. Exp. Immunol.* 108: 204-212.
12. Lehner, T. et al. 1991. *Infect. Immunol.* 59: 1434-1441.

表 1. 使用した合成ペプチドのアミノ酸シーケンス

Synthetic peptide	Peptide sequence
Human Hsp 60-kD (<i>hsp336-351</i>)	QPHDLGKVGIVTKDD
<i>S. sanguis</i> protein 95-kD (<i>BeS-1</i> , 229-243, No.2)	AFIVPHGGHFHYIPK
<i>S. sanguis</i> protein 95-kD (<i>BeS-1</i> , 373-385, No.3)	HGDHHHFIPYDKL
Retinal ganglion cells (<i>Brn-3b</i> , 11-25, No.1)	AFSMPHGGSLHVEPK
Retinal ganglion cells (<i>Brn-3b</i> , 177-189, No.4)	HHHHHHHQPHQAL



図 1. 実験感染マウスに見られた虹彩毛様体炎
好中球の浸潤が観察される。

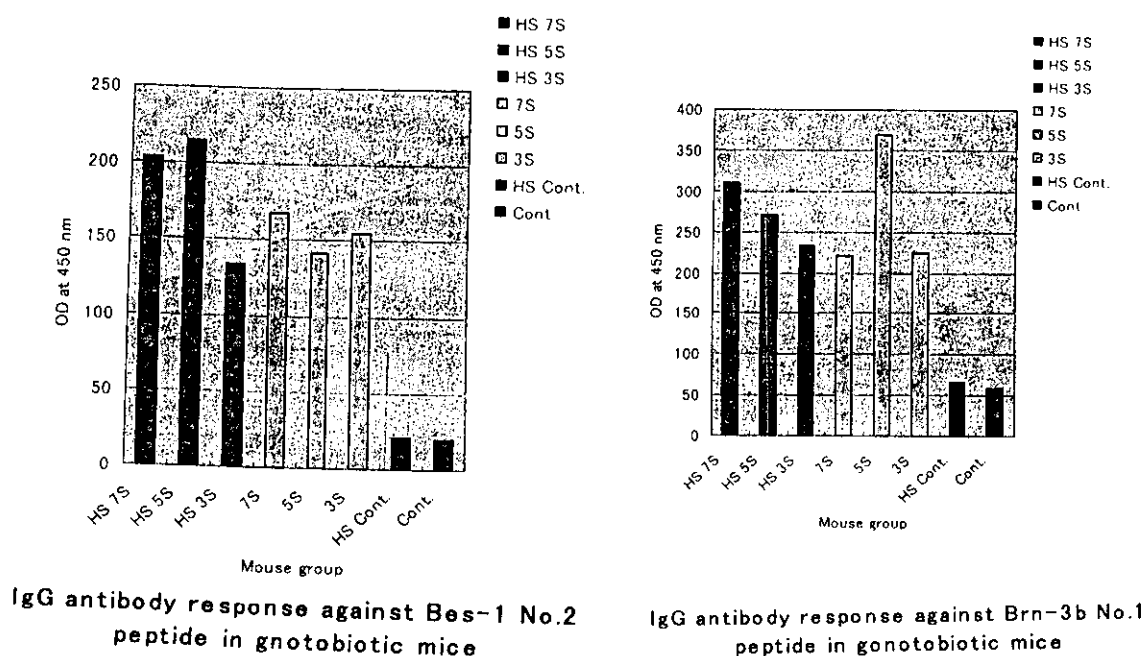


図 2. 網膜関連合成ペプチドに対する実験マウスでの抗体応答
HS : 熱ショックグループ、3S, 5S, 7S : $10^{3, 5, 7}$ の菌を接種

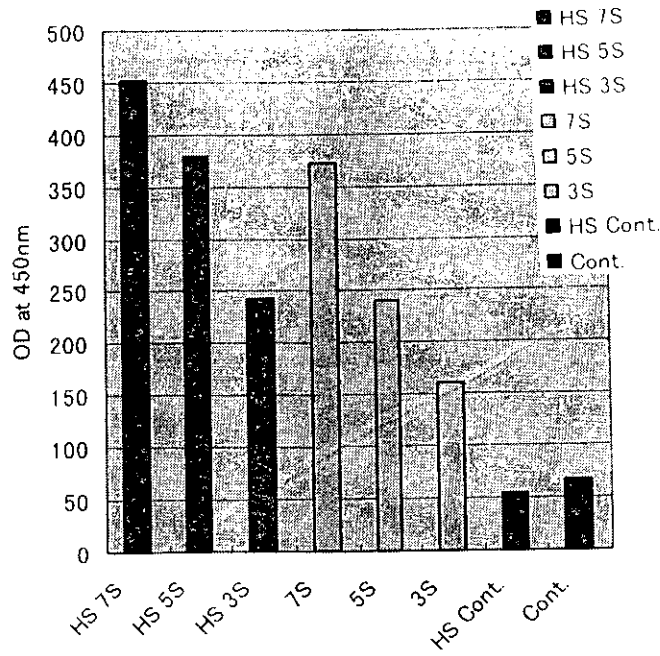


図2. Hsp 合成ペプチドに対する実験マウスでの抗体応答
 HS : 熱ショックグループ、3S, 5S, 7S : $10^{3, 5, 7}$ の菌を接種

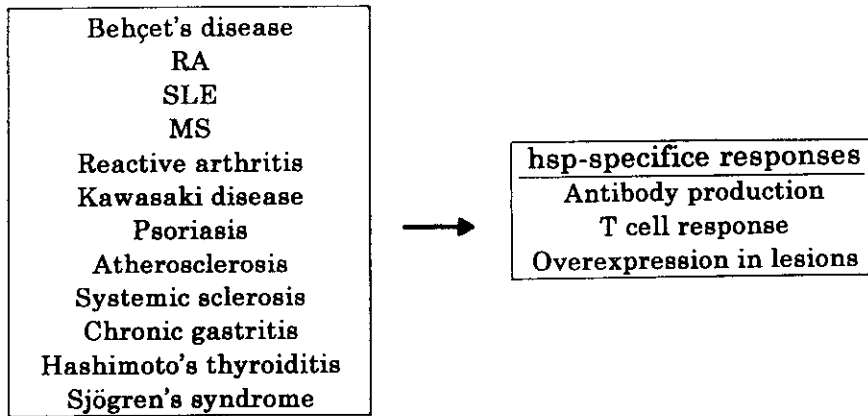


図4. ヒト自己免疫様疾患におけるHspに対する免疫応答

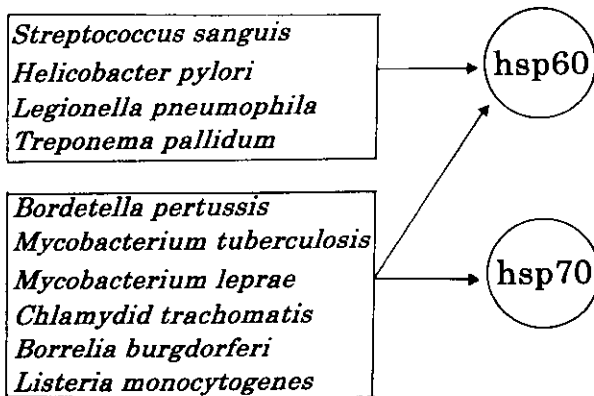


図5. 細菌感染症におけるHsp応答

G-C S F 遺伝子導入マウスを用いたベーチェット病発症メカニズムの解析

分担研究者

磯貝恵美子 北海道医療大学歯学部口腔衛生学教室
小海康夫 札幌医科大学医学部病理学教室
磯貝 浩 札幌医科大学医学部実験動物施設
横田憲治 岡山大学医学部細菌学教室
小熊恵二 岡山大学医学部細菌学教室
石原麻美 横浜市立大学医学部眼科学教室
大野重昭 横浜市立大学医学部眼科学教室

研究要旨

顆粒球コロニー刺激因子 (G-C S F) は本来顆粒球コロニーの形成を促進するサイトカインとして発見され、その強力な顆粒球造血作用や末血への造血幹細胞動員作用が注目されてきた。最近では、免疫系への作用も報告されている。我々は、こうした内因をもつマウスに外因の候補と考えられる *Streptococcus sanguis* の感染を試みた。*S. sanguis* (10⁹/ml) は口腔内および口腔粘膜下にそれぞれ 10 μ l を接種した。G-C S F 遺伝子導入マウスの対照として、そのリッターメイトマウスを使用した。感染 14 日目に眼の網膜抗原と高いホモロジーを示す Bes-1 ペプチドを口腔粘膜下に投与し、感染 18 日目まで観察した。*S. sanguis* は遺伝子導入マウスの口腔から回収することができた。一方、対照マウスの口腔からは回収できなかった。このことは G-C S F が好中球の機能を高め殺菌活性を高めるといった概念と一見矛盾するように見える。しかし、口腔という内なる外の環境で接種された菌はこの作用を免れると考えられた。また、粘膜下に接種された菌による強い組織傷害は本菌の付着定着を容易にしたのかもしれない。これらマウスでは局所において IL-6 などが検出された。実際、ベーチェット病患者の口腔上皮細胞は変性が強く、こうした細胞に *S. sanguis* はよく付着していた。G-C S F 遺伝子導入マウスの炎症は治癒しにくく、持続した。

A. 研究目的

顆粒球コロニー刺激因子 (G-C S F) は本来顆粒球コロニーの形成を促進するサイトカインとして発見され、その強力な顆粒球造血作用や末血への造血幹細胞動員作用が注目されてきた(1)。最近では、免疫系への作用や多くの臨床応用についての報告がある(2)。我々は G-C S F のもつ食細胞

活性酸素系に対して Priming はするが Triggering はしないという作用(3)に着目した。この作用は TNF などの他のサイトカインがダブル Positive の作用をもつことと異なっている。こうした内因をもつマウスに外因の候補と考えられる *Streptococcus sanguis* の感染を試みた。

B. 研究方法

S. sanguis (10⁹/ml) は口腔内およ

び口腔粘膜下にそれぞれ10 μ l を接種した。G-C S F 遺伝子導入マウスの対照として、そのリッターメイトマウスを使用した。感染14日目に眼の網膜抗原と高いホモロジーを示すBes-1ペプチドを口腔粘膜下に投与し、感染18日目まで観察した。

C. 研究結果

S.sanguis は遺伝子導入マウスの口腔から回収することができた。〔表1〕一方、対照マウスの口腔から*S.sanguis* は回収できなかった。口腔から回収できたTgマウスでは口腔粘膜病変が形成された〔表2〕。病変部を含めた組織でTNFは9匹中2匹に、IL-6は5匹で高かった。Bes-1ペプチドの刺激は口腔病変形成に影響を与えなかった。

D. 考察

以上の結果はG-C S F が好中球の機能を高め殺菌活性を高めるという概念と一見矛盾するよう見える。しかし、口腔という内なる外の環境で接種された菌はこの作用を免れると考えられた。また、粘膜下に接種された*S.sanguis*による強い組織傷害は本菌の付着定着を容易にしたのかもしれない。実際、ペーチェット病患者に

において、口腔上皮細胞は変性度が高く、これら細胞群に*S.sanguis*はよく付着することが示されている。感染Tgマウスでは局所においてIL-6などが検出された。G-C S F 遺伝子導入マウスの炎症は治癒しにくく、持続した。

E. 結論

G C F - T gマウスは好中球の機能亢進という点でペーチェット病の病態のひとつを反映している。このような機能亢進は*S.sanguis*感染において菌の定着や病変形性にも関与することがわかった。

引用文献

1. Metcalf, D. Blood, 1993, 377:591-594.
2. Pitrak, D. L. Current Opinion in Hematology, 1997, 4: 183-190
3. Wiltshcke, C. et al. J. Interferon Cytokine Res. 1995, 15: 249-253.
4. Isogai, E., et al. Microbial Ecology Health Dis., 1990, 3: 321-328.

表 1 . G-CSF Tg マウスにおける S. sanguis の回収成績

Group	Inoc.of <u>S. sanguis</u>	Reisolation <u>S. sanguis</u>	Effect of Bes-1 peptide
Tg mouse	+	8/9	No effect
	-	0/9	No effect
LM mouse	+	0/9	No effect
	-	0/9	No effect

表 1 . G-CSF Tg マウスにおける口腔病変

Group	Inoc.of <u>S. sanguis</u>	No. of mice with oral lesions	Increased level of TNF IL-6	
Tg mouse	+	7/9	2/9	5/9
	-	0/9	0/9	0/9
LM mouse	+	0/9	0/9	0/9
	-	0/9	0/9	0/9

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 松原光憲、磯貝 浩、磯貝恵美子 口腔由来嫌気性菌の感染によって全身症状を呈した土佐犬の 1 例、*獣医畜産新報* 52(8), 631-634, 1999
2. Isogai, H., Kosako, Y., Benno, Y., and Isogai, E. Ecology of Genus *Porphyromonas* in canine periodontal disease. *J. Vet. Med. B* 46, 467-473, 1999
3. Isogai, E., Isogai, H., Yokota, S., Amano, K.-I., Hayashi, S., Hirose, K., Oguma, K., Hirai, Y., and Sugiyama,

- T. Effect of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides on human polymorphonuclear neutrophils and endothelial cells. *Biosci. Microflora*, 18(2), 119-124, 1999
4. Hirose, K., Isogai, E., and Ueda, I. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae induce adhesion of monocytic cell line U937 to endothelial cells. *Microbiol. Immunol.* 44 (1),17-22, 2000
5. Isogai, E., Isogai, H., Hayashi, S., Kubota, T., Kimura, K., Fujii, N., Ohtani, T., and Sato, K. Effect of antibiotics, levofloxacin and

- fosfomycin, in the mouse model with *Escherichia coli* O157 infection. *Microbiol. Immunol.* 44(2), 89-95, 2000.
6. Miura, H., K. Miura, H. Mizugai, Y. Arai, E. Isogai Chewing ability and quality of life among the elderly residing in a rural community in Japan. *Journal of Oral Rehabilitation* (in press), 2000
 7. Hang'ombe, B. M., Isogai, E., Lungu, J., Mubita, C., Nambota, A., Kirisawa, R., Kimura, K., and Isogai, H. Detection and characterization of *Clostridium* species in soil of Zambia. *Comp. Immunol. Microbiol. Inf. Dis.* In press, 2000.
2. 国際学会発表
一般発表および特別講演
1. Isogai, E. Lyme disease - Tick-borne disease. Seminar in University of Zambia, Lusaka, Zambia, February 17, 1999
 2. Matsuo, K., Isogai, E., and Araki, Y. Structural and immunological studies on the antigenic polysaccharide of lipopolysaccharide isolated from *Leptospira biflexa* serovar *patoc* PatocI. International Leptospirosis Society, Marysville, Australia, August 22-25, 1999
 3. Isogai, E., Matsuo, K., Isogai, H., Miura, H., and Araki, Y. Proinflammatory cytokines, TNF-alpha, IL-6 and IL-1alpha induced by leptospiral lipopolysaccharide. International Leptospirosis Society, Marysville, Australia, August 22-25, 1999
 4. Isogai, H., and Isogai, E. Responses of human endothelial cells to leptospiral lipopolysaccharide. International Leptospirosis Society, Marysville, Australia, August 22-25, 1999.
- 招聘講演
1. Isogai, E. Cytokine and PAF in pathogenesis of leptospirosis, WHO Workshop (2000, Manila)
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
ロドトルーラ属 (*Rhodotorula*) 由来マンナンを利用した、レプトスピラ症の診断と予防
特許:平 1 1 - 3 5 7 8 5 0

ELISPOT 法によるベーチェット病患者末梢血のサイトカイン動態の解析

分担研究者	石ヶ坪良明	横浜市立大学医学部第一内科
	萩原恵里	同上
	大久保忠信	同上
	青木昭子	同上
	大野滋	同上
	上田敦久	同上
	中村聡	同眼科
	大野重昭	同眼科

研究要旨 ベーチェット病患者の末梢血中では、サイトカインTh1：Th2産生バランスはTh1に傾いていると認識されている。今回私達は、細胞を刺激することなくin vivoでのサイトカイン産生細胞数を直接検出できるサイトカインELISPOT法を用いて、ベーチェット病患者末梢血中のサイトカイン産生プロファイルを検討した。検出したサイトカインは、Th1サイトカインであるIFN γ 、Th2サイトカインであるIL-4、炎症性サイトカインであるTNF α の3種類であり、患者群は眼症状がありコントロールに難渋している群と、症状がなく安定している群に分け、健常者群と比較した。また各種濃度の抗IL-12抗体との培養により、上記サイトカイン産生細胞数がいかに変化するかを検討した。ベーチェット患者末梢血中では、活動性の高い患者群で有意にTh1サイトカインであるIFN γ 産生細胞数が増加していた。また、これらの患者群では炎症性サイトカインであるTNF α 産生細胞の増加も認めた。IL-4産生細胞数は頻度が少なすぎるため比較検討できなかった。抗IL-12中和抗体との培養により、患者末梢血中IFN γ 産生細胞数は減少する傾向にあったが、TNF α 産生細胞数の変化は認めなかった。

A. 研究目的

ベーチェット病患者末梢血単核球 (PBMC) のサイトカイン産生バランスは、Th1に傾いていると報告されている。現在までに使用された方法としては、(1)血清サイトカインレベルのELISAによる測定¹⁾、(2)末梢血細胞培養上清のELISAによる測定²⁾、(3)フローサイトメトリーによる細胞内サイトカイン検出³⁾がある。しかし、ELISAは感度が十分でなく、(3)はin vitroでのマイトジェン刺激を必要とするため、必ずしもin vivo

での状態を反映しているとはいえなかった。今回我々は、細胞を刺激することなく高感度にin vivoでのサイトカイン産生細胞を直接検出・定量しうるサイトカインELISPOT法⁴⁾を用いて、in vivoに最も近い無刺激下での患者PBMCのサイトカイン産生プロファイルを検討した。また、患者血清IL-12レベルは増加しているとの報告⁵⁾があるが、患者末梢血単核球を抗IL-12中和抗体と共に培養し、サイトカイン産生細胞数の変化を検討した。

B. 方法

眼発作を繰り返す活動性の高いベーチェット患者（ $n=4$ ）と、眼症状がなく安定している患者（ $n=3$ ）の末梢血より単核球（PBMC）を分離した。コントロールとして健常人（ $n=7$ ）末梢血を用いた。サイトカインELISPOT法は、以下の方法で行なった。すなわち、抗サイトカイン抗体をニトロセルロース96穴プレートに一晩コートし、翌日PBMCを一定の濃度でまく。18時間後細胞を洗い去り、ビオチン化抗サイトカイン2次抗体を加える。アビジナルカリフォスファターゼの後発色基質を加えると、サイトカインを産生した細胞のいた場所に一致して青色のスポットが現れる。これを一定倍率の顕微鏡下で数え、 10^6 個あたりの無刺激下でのIFN γ ・IL-4・TNF α サイトカイン産生細胞数を算定した。一部の実験では細胞にPHAを添加して同様の実験を行なった。さらに、患者PBMCを各種濃度の抗IL-12抗体と24時間培養した後にサイトカインELISPOT法を行ない、上記サイトカイン産生細胞数がいかに変化するかを検討した。

C. 研究結果

無刺激下でのサイトカイン産生細胞数をサイトカインELISPOT法にて定量した。結果はPBMC 10^6 個あたりの細胞数で示す。ベーチェット患者末梢血中では、コントロール群に比してTh1サイトカインであるIFN γ 産生細胞数が増加していた（図1）。活動性の高い患者群では健常者群に比し統計学的に有意の差を認めた（ $p<0.05$ ）。また、PHAによるマイトジェン刺激下でのIFN γ 産生細胞数も、安定期の患者に比して活動性の高い患者で高値であった（図2）。無刺激下での

TNF α 産生細胞数は、やはり健常者群に比して患者群では増加しており、活動性の高い患者群で有意の差を示した（ $p<0.05$ ）（図3）。IL-4産生細胞数は頻度が少なすぎるため比較検討できなかった。

患者PBMCを抗IL-12中和抗体（中和域濃度は1-3 $\mu\text{g/ml}$ ）と24時間培養した後、同様にサイトカインELISPOT法を行なった。図4に示す通り、IFN γ 産生細胞数は減少する傾向にあったが、TNF α 産生細胞数の変化は認めなかった。

D. 考察

サイトカインELISPOT法により得られた無刺激下でのサイトカイン産生細胞数は、IFN γ 産生細胞・TNF α 産生細胞ともコントロールに比して活動性の高い患者で有意に高値であった。これは今までの他の方法による報告と一致する結果であり、病態との関連が示唆される。サイトカインELISPOT法は細胞内サイトカイン染色よりも少なくとも1000倍感度が高く、また無刺激で検出できることより、よりin vivoに近い状態を反映しているものと思われる。IFN γ はin vitroでTNF α 産生を増強することが知られており、Th1サイトカインによる炎症性サイトカインの増強が示唆される。

一方、IL-12はTh1サイトカインを増強する上位調節因子でありIFN γ 産生を促進する。ベーチェット患者末梢血ではIL-12濃度が高いという報告もある。今回抗IL-12抗体との培養により、患者PBMC中のTNF α 産生細胞が変化するか否かを検討したが、少なくとも今回の系ではTNF α 産生細胞数の変化は認めなかった。IL-12・抗IL-12の系によるTNF α の調節については今後の検討を要する。

E. 参考文献

- 1) Alpsy, E et al. J.Dermatol. 1998; 25:513-6
2) Ohno, S et al. Ophthalmologica 1982; 185: 187-92
3) Sugi-Ikai, N et al. Ophthalmol. Vis. Sci. 1998; 39:996-1004
4) Hagiwara, E et al. Arthritis Rheum. 1996; 39:379-85
5) Frassanito, MA et al. Arthritis Rheum. 1999; 42:1967-74

Fig 1 Number of IFN producing cells

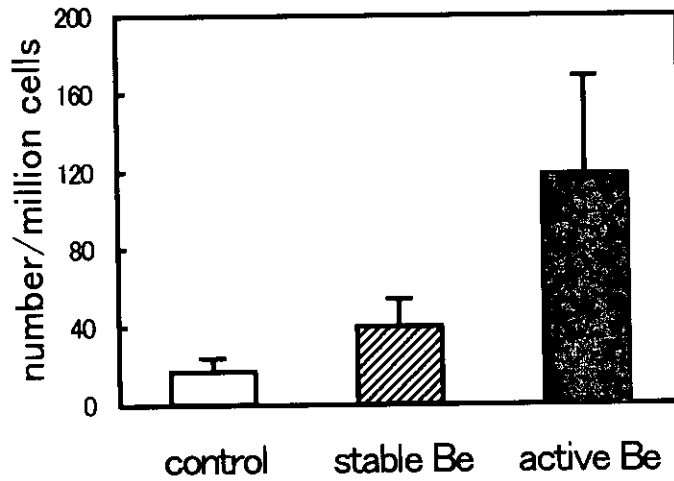


Fig 2 Number of IFN producing cells with PHA stimulation

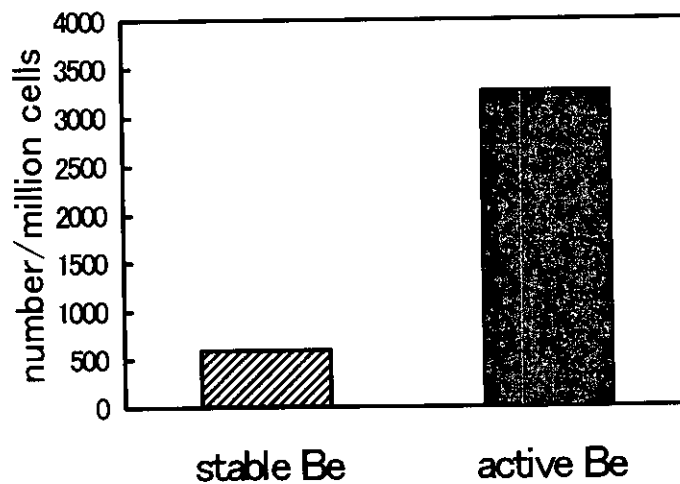


Fig.3 Number of TNF α producing cells

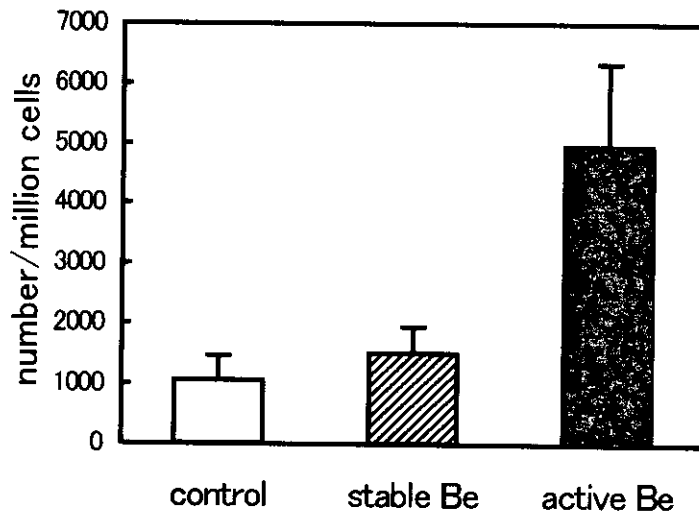
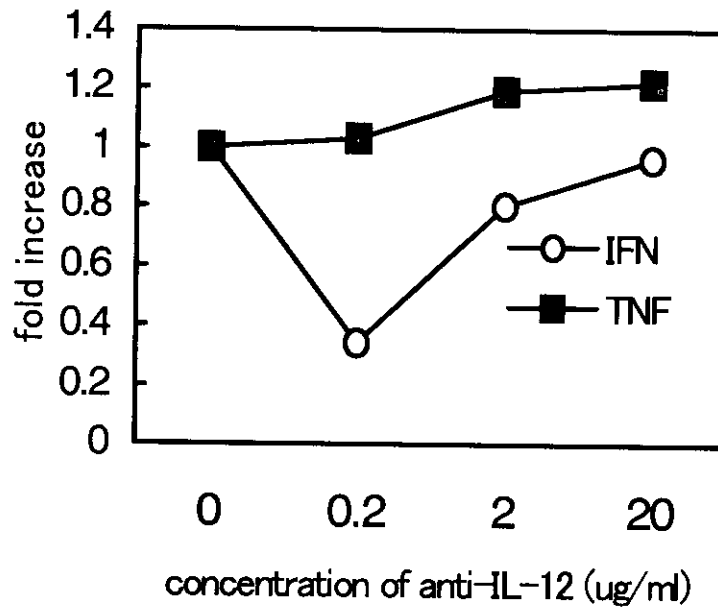


Fig.4 Cytokine producing cells after co-culture with anti-IL-12



ベーチェット病患者における Th1 型炎症の維持に対する Txk の重要性

分担研究者 坂根 剛 聖マリアンナ医科大学 免疫学病害動物学 教授
研究協力者 永瀨裕子 同大 難病治療研究センター 助手
鈴木 登 同大 免疫学病害動物学 助教授

研究要旨

ベーチェット病(B 病)は急性炎症の反復を特徴とする疾患で、その病態にはインターフェロン (IFN) γ を産生する Th1 型細胞の関与が示唆されている。我々は先に Tec ファミリーチロシンリン酸化酵素のひとつである Txk が IFN γ 産生に関与して、T リンパ球の Th1 型細胞への分化に関わることを報告した。B 病患者では疾患活動期には Txk を介した末梢血 T リンパ球による Th1 型優位のサイトカイン産生と皮膚病変部における Th1 型優位のサイトカイン産生を認めた。さらに B 病にみられた Txk の発現増強には IL-18, IL-12 の産生亢進が関与することを明らかにした。

A. 研究目的

ベーチェット病(B 病)は急性炎症の反復を特徴とする疾患で、その病態にはインターフェロン(IFN) γ を産生する Th1 型細胞の関与が示唆されている¹⁾²⁾。我々は先に Tec ファミリーに属する Txk が Th1 型サイトカインの一つである IFN γ 産生の調節に関与していることを報告した³⁾。本研究では B 病の病態形成における Txk の関与を明らかにする目的で、B 病患者末梢血 T 細胞と皮膚病変部におけるサイトカインの産生状態、及び Txk の発現状態を検討した。

B. 研究方法

1) B 病患者及び健常者へパリ加

末梢血よりフィコールハイパーク比重遠心法によりリンパ球を分離した。一部はヒツジ赤血球とのロゼット形成法により T 細胞を分離した。さらに一部はマグネットビーズを用いて CD4, CD8 陽性細胞に細分画した。

2) 非刺激状態でリンパ球を培養し、培養上清中のサイトカインを ELISA 法で測定した。

3) CD4, CD8 陽性細胞における IFN γ mRNA の発現を RT-PCR 法で検討した。

4) 患者及び健常者末梢血 T 細胞における Txk の発現はウエスタンブロット法で解析した。Jurkat 細胞を陽性コントロールとした。

5) B 病患者結節性紅斑の生検組織に

おける T α k 及びサイトカインの発現は免疫組織化学染色法にて検討した。アトピー性皮膚炎を対照疾患とした。B 病患者生検組織は聖マリアンナ医科大学皮膚科学溝口昌子教授より、アトピー性皮膚炎の生検組織は広島大学皮膚科学山本昇壮教授より供与された。

C. 研究結果

1) B 病患者末梢血リンパ球による自発的なサイトカイン産生を調べる目的で、非刺激状態でリンパ球を培養し、上清中のサイトカインを測定した。B 病患者では interleukin(IL)-4 産生は正常者と差がなく、IL-12、IFN γ の産生が増加していた。採血時に眼発作や口腔内アフタが存在し、赤沈が亢進した症例ではこれらサイトカイン産生の増加が認められた。

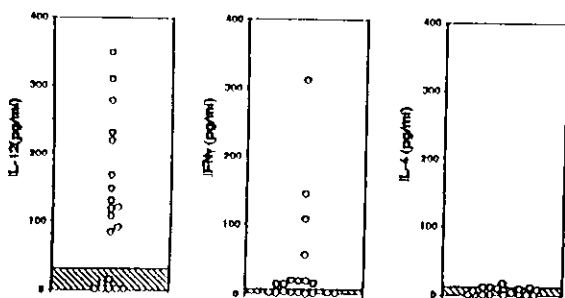


図 1

ベーチェット病患者末梢血リンパ球の自発的なサイトカイン産生性

▨ ; 正常範囲

2) 同一患者で眼発作時および寛解期

の末梢血リンパ球による自発的なサイトカイン産生性を検討した結果、眼発作時には IL-12、IFN γ の産生が増加するのに対し、寛解期には IL-12、IFN γ の産生は低下し、IL-4 産生の相対的な増加が認められた。

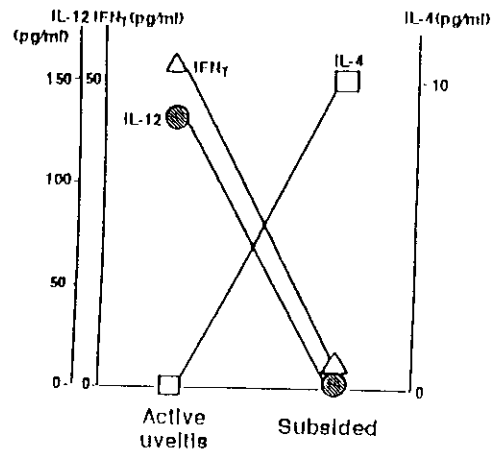


図 2 ベーチェット病患者における症状の発現、寛解期のサイトカイン産生パターン

3) IFN γ 産生細胞が CD4、CD8 いずれの T 細胞サブセットに属するかを調べる目的で、B 病患者末梢血 CD4、CD8 陽性細胞における IFN γ mRNA の発現を RT-PCR 法で検討した。非刺激状態では、CD4 にのみ IFN γ mRNA の発現を認める患者群と CD4 および CD8 両者に IFN γ mRNA の発現を認める患者群が存在した。

4) B 病患者末梢血 T 細胞での T α k の発現をウエスタンブロット法で検討した。正常者 T 細胞に比べ、B 病患者末梢血 T 細胞では T α k の発現が明