

らかに亢進していた。

5) B 病における Txk の役割を検討する目的で、B 病患者の結節性紅斑におけるサイトカイン産生性および Txk の発現を免疫組織化学染色法で検討した。Th2 型疾患として知られるアトピー性皮膚炎の新鮮病変部のリンパ球は IL-4 陽性で IFN γ 陰性であった。一方、B 病では IFN γ 陽性で IL-4 陰性であった。この成績は B 病の皮膚病変部に浸潤したリンパ球は Th1 型細胞が主体であることを示している。アトピー性皮膚炎の病変部のリンパ球は Txk を発現していなかったが、B 病患者皮膚病変では浸潤リンパ球に Txk の発現を認めた。

6) Txk の発現に関与するサイトカインを同定する目的で、Jurkat 細胞に各種サイトカインを添加し、培養後、Txk の発現をウエスタンブロット法で検討した。Th1 型サイトカインの産生を増強する IL-12, IL-18 を添加することにより Txk の発現は増強したが、Th2 型サイトカインである IL-4 の添加で Txk の発現は減弱ないし消失した。

7) B 病患者皮膚病変での Txk の発現に IL-12, IL-18 などのサイトカインが実際に関与しているかどうかを知るために、皮膚病変でのこれらサイトカインの発現を検討した。B 病患者皮膚病変部では IL-12 の産生を認

めた。IL-12 産生細胞は単核細胞であった。またリンパ球浸潤部位に IL-18 の発現を認めた。B 病患者ではケラチノサイトによる IL-18 の強い産生を認めた。一方、アトピー性皮膚炎ではリンパ球浸潤部位に IL-18 産生細胞は存在せず、また表皮における IL-18 の発現もごく微量であった。これらの成績から B 病患者皮膚病変では IL-12, IL-18 が産生され、Txk の発現を増強することで IFN γ の産生を増強すると考えられた。

D. 考察

我々は先に、T 細胞クローンでの Txk の発現を検討し、IFN γ を産生する Th1 型細胞および Th0 型細胞で Txk の発現を認めたのに対し、IL-4 を産生し、IFN γ を産生しない Th2 型細胞では Txk を発現しないことを報告した³⁾。さらに Txk は IFN γ のプロモーター活性を増強するが、IL-4 や IL-2 のプロモーター活性には影響しなかった³⁾。これらの成績は Txk が Th1 型細胞の分化と機能発現に対して転写因子として作用していることを示している。

本研究では B 病患者において末梢血 T 細胞は Th1 型優位なサイトカイン産生性を示し、特に疾患活動期には IFN γ 、IL-12 の産生増加を認めた。このことは B 病の病態形成に

Th1 型が重要な役割を果たすことを示している。また B 病患者の末梢血 T 細胞では Txk の発現亢進を認め、本症の Th1 型サイトカインの産生に Txk が関与すると考えられた。さらに B 病患者皮膚病変部においてもそのサイトカイン産生性は Th1 型優位で、その IFN γ 産生には Txk の関与することが判明した。皮膚病変部での Txk の発現増強には Th1 型サイトカインの産生を増加させる IL-18, IL-12 が関与した。これらの成績は、B 病において Txk を標的とする治療が可能であることを示している。

Txk は T 細胞の活性化とともに 30kD のアダプター蛋白をリン酸化し、Txk と 30kD 蛋白との複合体を形成して、核内へ移行し、IFN γ のプロモーター領域に転写因子として作用することが明らかになっている。B 病をはじめとする Th1 型疾患では Txk の発現が亢進しており、今後この Txk あるいは複合体を形成するアダプター蛋白を標的とした治療によって B 病征圧の道が開かれることを期待したい。

E. 結論

B 病患者では Th1 型優位なサイトカイン産生を認め、Txk の関与が判明した。この Txk の発現増強には IL-18, IL-12 の関与が考えられた。Txk は

B 病の治療のよい標的になることが窺えた。

F. 引用文献

- 1) Raziuddin S, al-Dalaan A, Bahabri S, Siraj AK, al-Sedairy S .: Divergent cytokine production profile in Behcet's disease. Altered Th1/Th2 cell cytokine pattern. J. Rheumatol. 25(2): 329-33, 1998.
- 2) Frassanito MA, Dammacco R, Cafforio P, Dammacco F .: Th1 polarization of the immune response in Behcet's disease: a putative pathogenetic role of interleukin-12. Arthritis Rheum. 42(9):1967-74, 1999.
- 3) Kashiwakura, J., Suzuki, N., Nagafuchi, H., Takeno, M., Takeba, Y., Shimoyama, Y., and Sakane, T. : Txk, a nonreceptor tyrosine kinase of the Tec family, is expressed in T helper type 1 cells and regulates interferon γ production in human T lymphocytes. J. Exp. Med. 190(8): 1147-1154, 1999.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nishiyama, M., Nakae, K., Masaki, F., Yukawa, S., Hashimoto, T., Inaba, G., Mochizuki, M., and Sakane, T. : A study of comparison between the nationwide epidemiological survey in

- 1991 and previous surveys on Behcet's disease in Japan. *Environmental Health and Preventive Medicine* 4(3) : 130-134, 1999.
- 2) 坂根剛、岳野光洋 : 質疑応答 : 反復する炎症とベーチェット病の診断. *日本医事新報*、3909号 104-105、1999.
- 3) 岳野光洋、坂根剛 : ベーチェット病. *臨床看護* 25(6) : 978-982, 1999.
- 4) 岳野光洋、坂根剛 : インフォームドコンセントの実際 - 患者説明へのポイント. II. 疾患編-アレルギー・リウマチ「Behcet 病」 *内科* 83(6) : 1351-1353, 1999
- 5) Kashiwakura, J., Suzuki, N., Nagafuchi, H., Takekoshi, M., Takeba, Y., Shimoyama, Y., and Sakane, T. : Txk, a nonreceptor tyrosine kinase of the Tec family, is expressed in T helper type 1 cells and regulates interferon γ production in human T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 190(8) : 1147-1154, 1999.
- 6) Sakane, T., Takekoshi, M., Suzuki, N., and Inaba, G. : Current concepts: Behcet's disease. *N. Engl. J. Med.* 341(17) : 1284-1291, 1999
- 7) 坂根剛 : 主要疾患の診療ポイント : アレルギー・膠原病 : Behcet 病. 改訂第2版 外来診療のすべて (高久史磨総監修)、メジカルビュー社、東京、pp800-801, 1999.
- 8) Sakane, T., Takekoshi, M., and Suzuki, N. : Behcet's disease (Correspondence). *N. Engl. J. Med.* 342(8) : 588-589, 2000.
- 9) 坂根剛、岳野光洋 : ベーチェット病の免疫異常. *Modern Physician* 20(1) : 47-51, 2000.
- 10) 坂根剛、岳野光洋 : ベーチェット病. *イヤートラサトラス* (青木裕美、川瀬泰弘編)、メディックメディア、東京、pp167-170, 2000.
- 11) 下山義博、岳野光洋、永渕裕子、鈴木登、坂根剛 : ベーチェット病患者好中球における自発的サイトカイン産生. *炎症* 20(2) : 157-164, 2000.
- 12) Sakane, T., and Takekoshi M. : Behcet's disease. Etiopathology: Immunological aspects. *The Clinical Understanding of Behcet's Disease.* (Ed. by S. Lee, D. Bang and E. S. Lee). Springer-Verlag, Germany (in press).
- 13) Sakane, T., and Suzuki, N. : Behcet's syndrome. *The Molecular Pathology of Autoimmunity* (second edition) (Ed. by A. N. Theofilopoulos and C. A. Bona), Gordon and Breach Science Publishers, Pennsylvania (in press).

2) Sakane, T., and Takeno, M. : Interferon therapy in Behcet's disease. Internal Medicine (in press).

3) Sakane, T., and Takeno, M. : Current therapy in Behcet's disease. Skin Therapy Letter (in press).

16) 坂根剛 : ベーチェット病 (内科)、今日の治療指針 2001 年版—私はこう治療している (多賀須幸男、尾形悦郎、山口徹、北原光夫総編集者)、医学書院、東京 (印刷中) .

2. 学会発表

1) 下山義博、岳野光洋、永淵裕子、坂根剛 : ベーチェット病患者好中球におけるサイトカイン産生の異常. 第 43 回日本リウマチ学会総会・学術集会 平成 11 年 6 月 3 日.

2) 岳野光洋、下山義博、坂根剛 : ベーチェット病患者 NK 細胞における Killer inhibitory receptor (KIR) の発現の異常. 第 43 回日本リウマチ学会総会・学術集会 平成 11 年 6 月 3 日.

3) 安田優、星恵子、周新平、緋田めぐみ、山本直弘、坂根剛 : Pooled control を用いたベーチェット病の症例—対照研究. 第 43 回日本リウマチ学会総会・学術集会 平成 11 年 6 月 3 日.

4) 田中千絵、松田隆秀、今村愉子、赤荻淳、行形毅、下條貞友、飯野四郎、岳野光洋、坂根剛、川口洋 : 神経型ベーチェット病 24 例の臨床的検討. 第 43 回日本リウマチ学会総会・学術集会 平成 11 年 6 月 3 日.

5) 岳野光洋、永淵裕子、下山義博、鈴木登、坂根剛 : 若手研究者の Research Progress Lecture-4: ベーチェット病と自己ストレス蛋白特異的 T ヘルパー 1 細胞. 第 43 回日本リウマチ学会総会・学術集会 平成 11 年 6 月 4 日.

6) 鈴木登、永淵裕子、武半優子、柏倉淳一、岳野光洋、坂根剛 : Th1 サイトカイン産生における Tec family チロシンキナーゼの Txk の役割. 第 64 回日本インターフェロン・サイトカイン学会総会・学術集会 平成 11 年 7 月 24 日.

7) 鈴木登、永淵裕子、武半優子、柏倉淳一、岳野光洋、坂根剛 : Tec family チロシンキナーゼ、ヒト Txk の Th1 サイトカイン産生に果たす役割. 第 49 回日本アレルギー学会・総会 平成 11 年 10 月 19 日.

8) 岳野光洋、下山義博、坂根剛 : ベーチェット病患者 NK 細胞における Killer inhibitory receptor (KIR) の選択的発現低下. 日本免疫学会総会・学術集会 平成 11 年 12 月 1

日.

9) 平野雅裕、鈴木登、武半優子、柏倉淳一、永淵裕子、坂根剛：各種免疫疾患におけるヒト Th1 細胞特異的 Tec Family チロシンキナーゼ蛋白、Txk の発現に関する検討. 日本免疫学会総会・学術集会 平成11年12月3日

10) 井上奏、鈴木登、永淵裕子、柏倉淳一、坂根剛：Non-receptor type Tec family tyrosine kinase, Txk のインターフェロン γ 遺伝子発現調節機序. 日本免疫学会総会・学術集会 平成11年12月3日.

11) 柏倉淳一、鈴木登、豊島聡、坂根剛：ヒト Th1 細胞の分化における Tec ファミリー非受容体チロシンリン酸化タンパク質 Txk の役割. 日本免疫学会総会・学術集会 平成11年12月3日.

H. 知的所有権の取得状況

なし

ベーチェット病患者末梢血単核球におけるアポトーシス関連分子発現の検討

主任研究者	大野重昭	横浜市立大学医学部眼科学教室
	今川由香利	横浜市立大学医学部眼科学教室
	中村 聡	横浜市立大学医学部眼科学教室
	杉田美由紀	横浜市立大学医学部眼科学教室
	鳥山聖子	横浜市立大学医学部眼科学教室
	今井由美	横浜市立大学医学部眼科学教室

研究要旨

[目的] ベーチェット病患者末梢血単核球において、アポトーシス関連分子である Bcl-2 及び Bax の発現率をタンパク質レベルで解析し、さらに Caspase 8 の活性を測定した。

[方法] ベーチェット病患者 10 例を対象とした。また、健康成人 5 例を正常対照として用いた。末梢血をヘパリン加採血し、単核球を分離した。これよりタンパク質を抽出し、Bcl-2 及び Bax の発現量を解析した。さらに Caspase 8 の活性を測定し正常対照と比較した。

[結果] 活動期ベーチェット病患者の末梢血単核球における Bcl-2 タンパク質の発現量は $1.34 \pm 0.85 \mu\text{g}$ で、非活動期ベーチェット病患者の $0.22 \pm 0.30 \mu\text{g}$ 及び正常対照の $0.56 \pm 0.30 \mu\text{g}$ と比較して有意に高値であった。一方、Bax タンパク質の発現量は各群に有意な差はみられなかった（活動期患者群 $0.33 \pm 0.13 \mu\text{g}$ 、非活動期患者群 $0.28 \pm 0.22 \mu\text{g}$ 、正常対照 $0.44 \pm 0.14 \mu\text{g}$ ）。さらに、Bcl-2/Bax の比を求め各群で比較したところ、活動期患者群 (4.05 ± 2.81) は非活動期患者群 (1.24 ± 1.36) と比較して有意に高値であった。Caspase 8 の活性は各群に有意な差はみられなかった（活動期患者群 0.03 ± 0.02 、非活動期患者群 0.02 ± 0.01 、正常対照 0.03 ± 0.01 ）。

[結論] 活動期ベーチェット病患者の末梢血単核球では Bcl-2 が過剰に発現していることによりアポトーシスが抑制され、その炎症病態が形成されていることが示唆された。

A. 研究目的

過剰な炎症反応は自己組織を傷害し機能障害を引き起こすため、浸潤してきた炎症細胞は活性化して役割を果たした後に、アポトーシスを起こして除去されることが知られている¹⁾。近年の動物モデルを用いた研究から、このような活性化した免疫細胞は Fas を介したアポトーシスを起こして除去される可能性が明らかとなってきた²⁾。Fas を介してアポトーシスのシグナルが伝達されると、Fas の細胞質領域にある死の領域 DD (death domain) と、DD 類似配列である死の実行領域 DED (death effector domain) と DD の両方を持つ FADD (Fas associated death domain) が DD 同士で会合する。FADD は同様に DED を持つ procaspase 8 と DED 同士で会合し、Fas と

FADD、procaspase 8 から成る DISC (death-inducing signaling complex) と呼ばれる複合体が形成される。すると、低活性ながら活性を持つ procaspase 8 が自己消化により限定分解され、活性型の Caspase 8 となる。この Caspase 8 はその他の Caspase 群を活性化し、種々のタンパク質が切断され、アポトーシスが実行される³⁾。これに対し、Bcl-2 は procaspase 8 の限定分解を阻害することによりアポトーシスを抑制し、また、Bax は Bcl-2 を阻害することによりアポトーシスを促進させるのではないかと考えられており、Bcl-2 と Bax の量比でアポトーシスの傾向が決定すると示唆されている^{4,5)}。

これまで我々は、ベーチェット病の病態はリンパ球のアポトーシスが起こりにくいことにより形成されることを報告してきた⁶⁾。今回は、

アポトーシスシグナルの異常を検出するため、アポトーシス関連分子の発現をタンパク質レベルで解析した。

B. 研究方法

対象はベーチェット病患者 10 例で、疾患の活動性から平均して月 1 回以上の発作を 3 か月以上繰り返す症例 6 例を活動期患者群、3 か月以上発作のみられない症例 4 例を非活動期患者群に分類した。また、正常対照として健康成人 5 例を用いた。

末梢血をヘパリン加採血し、単核球を分離した。これよりタンパク質を可溶化し、SDS-PAGE を行った。分離したタンパク質は PVDF 膜に電気泳動ブロッティングし Bcl-2 及び Bax のモノクローナル抗体を一次抗体として反応させ、ABC 法による免疫ペルオキシダーゼ染色を行った。蛍光発色させた PVDF 膜は、NIH Image を用いたデンストメトリーにより各バンドの分子量マーカーとの比を求め、タンパク量を解析した。また、Caspase 8 の活性は、 1×10^7 個の末梢血単核球からタンパク質を可溶化し、Caspase 8 の其質を蛍光標識した IETD-pNA を反応させ、405nm の吸光度を測定した。

統計学的な有意差の検定には Mann-Whitney 検定を用いた。
(倫理面への配慮)

実験に際して、全ての患者及び健康成人からインフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

1. Bcl-2 及び Bax の発現量

Bcl-2 の発現量は、活動期患者群では $1.34 \pm 0.85 \mu\text{g}$ で、非活動期患者群の $0.22 \pm 0.30 \mu\text{g}$ 及び、正常対照群の $0.56 \pm 0.30 \mu\text{g}$ と比較して、有意に発現が増強していた ($p < 0.05$) (図 1)。Bax の発現量は、活動期患者群は $0.33 \pm 0.13 \mu\text{g}$ 、非活動期患者群は $0.28 \pm 0.22 \mu\text{g}$ 、また正常対照群は $0.44 \pm 0.14 \mu\text{g}$ で、各群に有意な差はみられなかった (図 2)。Bcl-2 と Bax の比を求め、各群で比較したところ、活動期患者群は非活動期患者群と比較して有意に高値を示した ($p < 0.05$) (図 3)。

2. Caspase 8 の活性

Caspase 8 の活性を測定したところ、各群に有意な差はみられなかった。

D. 考察

炎症性疾患の病態形成には、Fas を介したアポトーシスの抑制が関与しているのではないかと考えられている。炎症局所で活性化した細胞は活性化誘導型細胞死 (AICD) という免疫応答を終息させる機序により、Fas を介したアポトーシスを起こして除去される可能性が明らかとなってきた²⁾。この Fas を介するアポトーシスは Caspase と呼ばれるプロテアーゼが活性化され、これが数多くの其質を切断することによって引き起こされるが、この過程において Fas からのアポトーシスシグナルを最初に受けるのが Caspase 8 で、この酵素がシグナルの下流にある Caspase を限定分解し活性化することにより、さまざまな基質が限定分解されアポトーシスが実行される⁷⁾。また、Caspase は好中球の機能を低下させることにより、適切な時期に炎症反応を終わらせる役割を持っている⁸⁾。

Bcl-2 family はアポトーシスを制御するタンパク質として知られている^{4,5)}。Bcl-2 はアポトーシス抑制、また Bax はアポトーシス促進に働くと考えられているが、その制御機構は明確ではない。しかし、細胞のアポトーシスへの傾向は Bcl-2 と Bax の比によって決まるとされている⁹⁾。活動性の全身性エリテマトーデス (SLE) では、末梢血リンパ球において Bcl-2 がより多く発現しアポトーシスが抑制されていることが報告されている^{10,11)}。また、炎症性の自己免疫疾患である慢性関節リウマチの滑膜に浸潤しているリンパ球には、アポトーシス抑制分子である Bcl-2 ファミリーに属する Bcl-x の発現が亢進していることが報告されている¹²⁾。活動期の自己免疫性肝炎患者の末梢血単核球においても Bcl-2 が増加しており、ステロイドによる治療で疾患が寛解すると Bcl-2 の発現量が減少するという報告もある¹³⁾。

今回の実験では、活動期患者群の末梢血単核球におけるアポトーシス抑制タンパク質 Bcl-2 の発現量が有意に増加していた。さらに、

アポトーシス促進タンパク質である Bax の発現量は各群における有意な差はみられなかった。また、Bcl-2/Bax 比を求めたところ、活動期患者群は、非活動期患者群と比較して有意に高値を示した。一方、Caspase 8 の活性は各群に有意な差はみられなかった。

E. 結論

以上の結果から、活動期ベーチェット病患者の末梢血単核球は Bcl-2 が過剰に発現していることによりアポトーシスが抑制され、その炎症病態が形成されていることが示唆された。

[参考文献]

- 1) Nagata S: Apoptosis by death factor. *Cell* 88: 355-365, 1997.
- 2) Brunner T et al: Cell-autonomous Fas(CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature* 373: 441-444, 1995.
- 3) Kischkel FC et al: Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 14: 5579-5588, 1995.
- 4) Chao DT et al: Bcl-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 16: 395-419, 1998.
- 5) Reed JC: Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 387: 773-776, 1997.
- 6) 中村 聡: ぶどう膜炎の細胞生物学. *日眼会誌* 101: 975-986, 1997.
- 7) 米原 伸: FLASH-Fas 誘導アポトーシスで Caspase-8 活性化に関わる新規 CED-4 様分子-. *細胞工学* 18: 932-936, 1999.
- 8) 山下浩平, 高橋 淳: アポトーシスの実行分子カスパーゼ. *最新医学* 54: 27-33, 1999.
- 9) Julie LR et al: Errors of homeostasis and deregulated apoptosis. *Curr opin Genet Dev* 7: 597-602, 1997.
- 10) Ohsako S, Hara M et al: Expression and function of Fas antigen and bcl-2 in human systemic lupus erythematosus lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol* 73: 109-114, 1994.
- 11) Aringer M, Wintersberger W et al: High levels of bcl-2 protein in circulating T lymphocytes, but not B lymphocytes, of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 37: 1423-1430, 1994.
- 12) Matsuno H, Sawai T et al: Treatment of rheumatoid synovitis with anti-reshaping human interleukin-6 receptor monoclonal antibody. -use of rheumatoid arthritis tissue implants in SCID mouse model-. *Arthritis Rheum* 41: 2014-2021, 1998.
- 13) Yachida M, Kurokohchi K et al: Increased bcl-2 expression in lymphocytes and its association with hepatocellular damage in patients with autoimmune hepatitis. *Clin Exp Immunol* 116: 140-145, 1999.

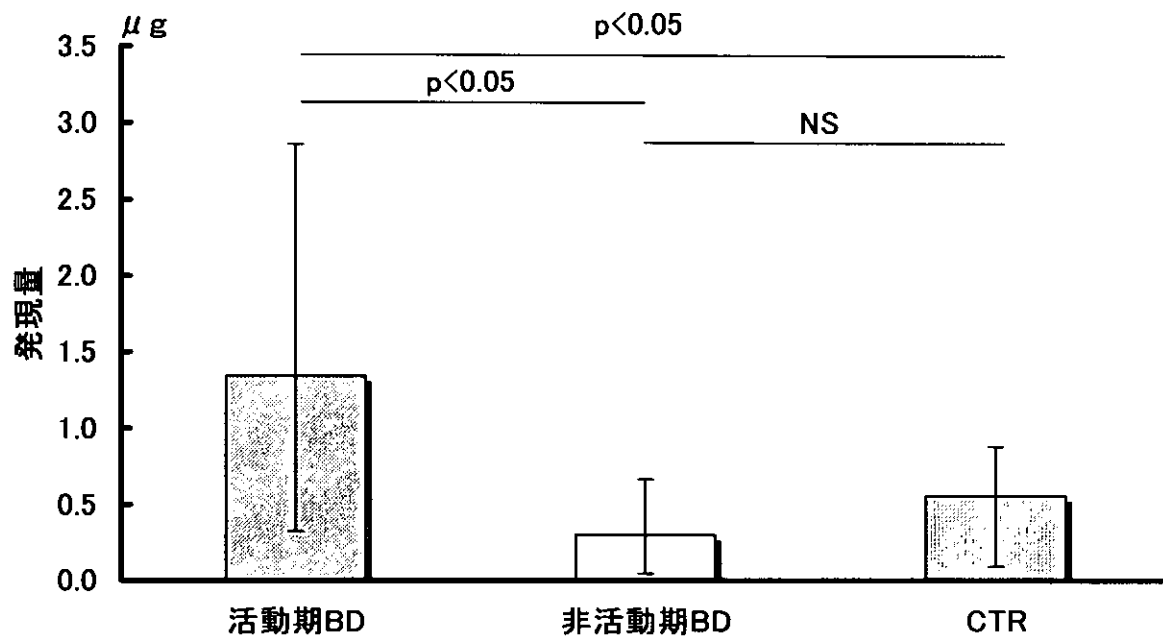


図1 Bcl-2の発現量

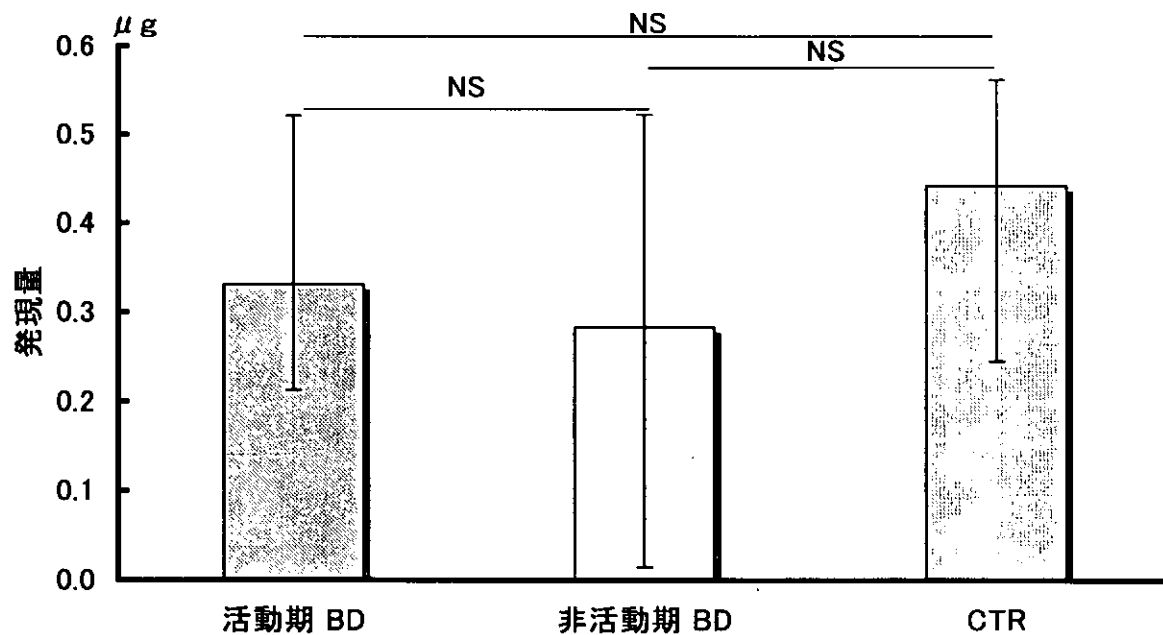


図2 Baxの発現量

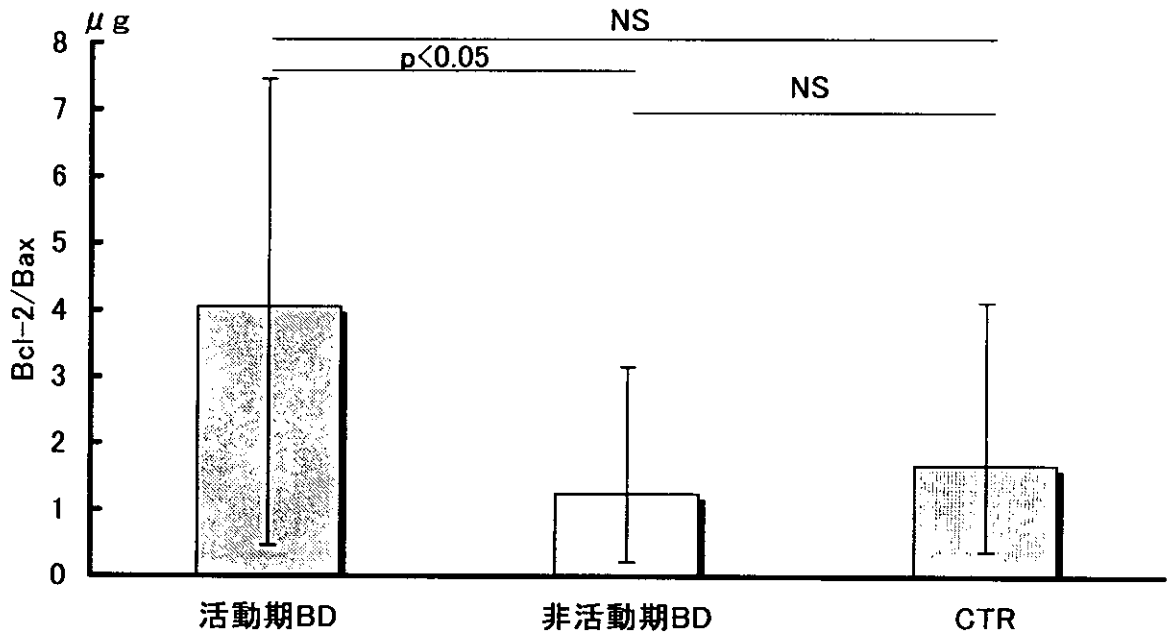


図 3 Bcl-2/Bax 比

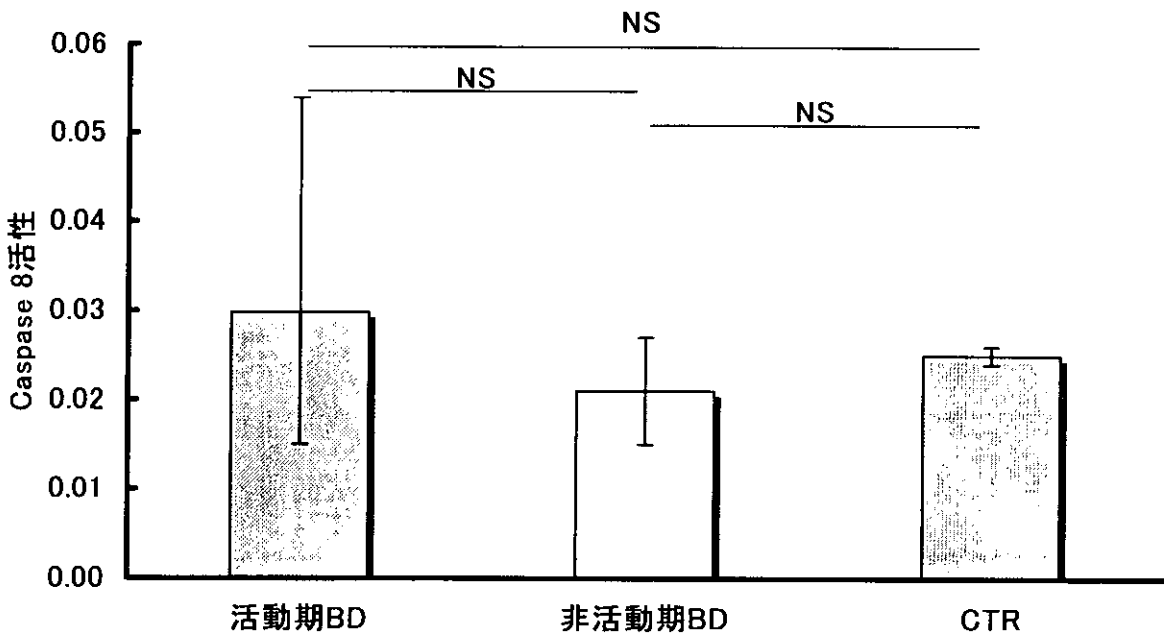


図 4 Caspase 8 活性

ベーチェット病における精巣特異抗原に対する自己抗体

桑名 正隆 (慶応義塾大学医学部、先端医科学研究所)
安岡 秀剛 (慶応義塾大学医学部、内科)
三森 経世 (慶応義塾大学医学部、内科)
河上 裕 (慶応義塾大学医学部、先端医科学研究所)

<研究要旨>

ベーチェット病における精巣特異抗原 HSS-A に対する自己抗体の陽性頻度、臨床的意義を検討した。ベーチェット病 43 例、結節性多発動脈炎やヴェーゲナー肉芽腫症などの全身性血管炎 12 例、健常人 23 例を対象として、HSS-A の部分断片を発現させたリコンビナント融合蛋白を抗原とした免疫ブロット法により血清中の抗 HSS-A 抗体を検出した。抗 HSS-A 抗体はベーチェット病 4 例 (9%) に検出されたが、全身性血管炎や健常人では検出されなかった。抗 HSS-A 抗体陽性 4 例は全例が男性で、そのうち 3 例は神経あるいは血管ベーチェットを有していた。各種ヒト組織由来の cDNA のパネルを用いた PCR により HSS-A の mRNA は精巣にのみ高発現されていることが確認された。以上の成績より、精巣特異抗原 HSS-A に対する自己抗体はベーチェット病男性例に特異的に検出され、神経、血管ベーチェットと関連する可能性が示された。抗 HSS-A 抗体の産生機序として、ベーチェット病に伴う精巣、精巣上体の血管炎により本来は隔絶抗原である HSS-A が免疫系に暴露されることが推測された。

分担研究者

桑名 正隆

慶應義塾大学医学部先端医科学

助手

A. 研究目的

ベーチェット病患者血清中に検出される自己抗体として抗カルジオリピン抗体、抗血管内皮細胞抗体などが報告されているが、ベーチェット病に特異的な自己抗体やベーチェット病の特定の病像と関連する自己抗体の報告はない。我々は、ヒト精巣特異抗原として報告されている human sperm surface protein (HSS)²⁾ の alternative splicing 産物 (HSS-A) に対する自己抗体が強皮症患者血清中に存在することを見出した。抗 HSS-A 抗体は皮膚硬化範囲が広範な diffuse 型で重篤な心、肺病変のために予後の悪い強皮症の病型と関連した。

精巣は結節性多発動脈炎、ヴェーゲナー肉芽腫症などの全身性血管炎において高頻度に血管炎をきたす部位である。精巣は免疫系から隔絶された組織とされ、精巣にのみ存在する抗原に対する免疫寛容は成立しないと考えられている。そのため、精巣や精巣上体（副睾丸）の血管炎による組織障害のため精巣特異抗原が免疫系に暴露されれば、それらに対する抗体が産生される可能性がある。そこで、本研究では精巣、精巣上体の血管病変を高頻度に伴うベーチェット病患者および全身性血管炎患者において、HSS-A に対する自己抗体を検索し、抗体陽性例の臨床特徴について検討した。

B. 研究方法および対象

1. 対象

厚生省研究班の診断基準を満たすベーチ

ェット病（完全型、不全型を含む）43例、全身性血管炎12例（結節性多発性動脈炎6例、アレルギー性肉芽腫性動脈炎2例、ヴェーゲナー肉芽腫症2例、顕微鏡的多発動脈炎1例、悪性関節リウマチ1例）を対象とし、健常人23例をコントロールとして用いた。ベーチェット病19例、全身性血管炎4例、健常人17例が男性であった。

ベーチェット病患者の臨床症状は面談および診療カルテにより履歴的に調べた。

2. 抗HSS-A抗体の検出

HSS-AのcDNAは766個のアミノ酸から構成されるHSSの49-237番目のアミノ酸部分をコードしていたが、81番目のアミノ酸の後に14個のアミノ酸に相当する42bpのDNA断片が挿入されていた（図1）。HSSおよびHSS-Aに挿入された塩基配列はすべてヒト17番染色体上に存在することから、HSS-AはHSSのalternative splicingの産物と考えられた。

HSS-AのcDNAを蛋白発現ベクターpMal-c2にサブクローニングし、HSS-Aをmaltose-binding protein (MBP)との融合蛋白として発現させた。HSS-A融合蛋白の発現を誘導した大腸菌の可溶分画を7.5%ポリアクリルアミド-SDS電気泳動で分画後、ニトロセルロース膜へ転写した。250倍希釈して抗大腸菌抗体を吸収した患者血清を1次抗体、アルカリフォスファターゼ標識抗ヒトIgG抗体を2次抗体として反応させた。NBT/BCIPを基質とした発色により、HSS-A融合蛋白に対する反応性を検出した。

3. 培養細胞および正常組織におけるHSS-AのmRNA発現の検出

24種類の腫瘍細胞株（888mel、A375mel、

U-87.MO、T98G、K1S、LU99、LK2、EBC1、SBC1、RERF-LC-MA、TE8、TE10、HepG2、PK1、SAITO、KU7、BC47、PC3、MDA231、HS578、HL60、K562、Molt4、Daudi)、2種類のEBVトランスフォームB細胞株(K4B、LGL)、腫瘍に浸潤したT細胞から樹立した2種類のT細胞株(1362TIL-1、1362TIL-2)および正常組織(脳、心臓、腎臓、脾臓、肝臓、膵臓、小腸、骨格筋、肺、精巣、胎盤、胃)から全RNAを抽出した。Oligo (dt)₂₅を用いた逆転写反応により合成した一本鎖cDNAをテンプレートとしたPCRにより、HSSおよびHSS-AのcDNAを増幅した。PCRではHSS-Aに挿入された42bpを含む産物が増幅されるような特異的プライマー(sense: 5-ggattgcttacacctgacac-3、antisense: 5-tttggtgggagtgcttgaac-3)を用いた。cDNAの量的な評価のため、β-actinのcDNAも特異的プライマー(sense: 5-atctggcaccacaccttctacaatgagctgcg-3、antisense: 5-cgtcatactcctgcttgctgatggacatgtgc-3)を用いて増幅した。PCR産物は2%アガロースゲル電気泳動で分画し、エチジウムブロミドで染色した。

(倫理面への配慮)

すべての患者および健常人の検体はインフォームドコンセントを得た上での提供を受けた。

C. 研究結果

1. 抗HSS-A抗体の検出

図2にHSS-A融合蛋白を発現させた大腸菌の可溶分画を抗原とした免疫プロットの結果を示す。レーン2-5に示すベーチェット病患者血清は約80kDaのHSS-A融合蛋白と反応した。抗HSS-A抗体はベーチェ

ット病患者43例中4例(9%)に検出された。一方、抗HSS-A抗体は全身性血管炎患者12例、健常人23例には検出されなかった。

抗HSS-A抗体陽性の4例は全例が男性であった。ベーチェット病男性患者19例における抗HSS-A抗体の陽性頻度(19%)は女性患者24例における頻度(0%)に比べて有意に高率であった(P=0.03)。

2. 抗HSS-A抗体陽性例の臨床特徴

HSS-Aに対する反応性の有無によりベーチェット病患者を層別化し、ベーチェット病に見られる臨床症状について比較した(表1)。アフタ性口内炎、皮膚症状、陰部潰瘍、眼病変の頻度は両群間で差はなかった。神経および血管ベーチェットは抗HSS-A抗体陽性例で陰性例に比べて高頻度にみられたが、統計学的な有意差はなかった。

3. 培養細胞および正常組織におけるHSS-AのmRNAの発現

図3にHSSおよびHSS-AのmRNAの発現をRT-PCRで解析した結果を示す。合計28の腫瘍細胞株、EBVトランスフォームB細胞株、T細胞株のうち26株でHSSのmRNAの発現を認めた。また、HSSのmRNAは心臓を除く全ての正常組織でも発現されていた。HSS-AのmRNAはHSSを発現していた26の培養細胞株で発現されていたが、正常組織で発現していたのは精巣のみであった。コントロールとして用いたβ-actinの発現量はサンプル間で多少の差を認めたが、HSSおよびHSS-Aの発現の有無についての評価は可能と考えられた。

D. 考察

我々がクローニングしたHSS-Aは精巣

特異抗原として報告されていたHSSと高い塩基配列の相同性を認め、第17番染色体上に存在するゲノムDNAの塩基配列からHSSのalternative splicingによる産物と考えられている。今回の成績ではHSSのmRNAは心臓を除く全ての組織で発現されており、従来の報告とは異なっていた。一方、HSS-AのmRNAは正常組織では精巣のみに発現されており、精巣特異的と考えられた。ただし、癌化あるいはEBV感染や高濃度のサイトカイン存在下での培養などによる細胞の形質転換によりHSS-Aの発現が誘導された。精子の分化過程では高度の細胞分裂を伴うことから、HSS-Aの機能として細胞増殖に関連することが推測された。

今回、HSS-Aの一部を発現するリコンビナント蛋白を用いて、HSS-Aに対する自己抗体を検索した。その結果、HSS-Aに対する自己抗体はベーチェット病男性例にのみ検出された。陽性頻度は男性例の21%と少なかったものの、ベーチェット病による神経または血管病変を持つ症例に高頻度に検出された。今後さらに症例数を増やして検討する必要があるが、本抗体がベーチェット病の重篤な合併症である神経ベーチェットや血管ベーチェットの指標になる可能性が考えられた。

本来HSS-Aは精巣でしか発現されない隔絶抗原であることから、何らかの機序で免疫系に暴露されれば容易に抗体産生を含めた免疫応答が誘導されると考えられる。ベーチェット病では精巣や精巣上体に血管炎を伴う炎症をきたすことが知られている³⁾。したがって、精巣や精巣上体の炎症により同部位に存在するバリアが障害され、精巣蛋白が免疫系に暴露され、抗HSS-A抗体が産生された可能性がある。抗HSS-

A抗体は男性例にのみ検出され、また血管炎が病態に関連する神経、血管ベーチェットを持つ症例に高頻度に検出されたことも、この仮説に一致する所見であった。

ただし、同様に精巣や精巣上体に高頻度に血管炎を伴う全身性血管炎患者では抗HSS-A抗体は検出されなかった。全身性血管炎男性症例が4例と少なかったためと考えられるが、全身性血管炎とベーチェット病の病態の違いによる可能性も否定できない。例えば、血管炎を起こす血管の太さ、静脈炎の併存の有無、患者のHLAクラスII遺伝子の違いなどが抗HSS-A抗体産生と関与する可能性が考えられた。

ベーチェット病男性例では不妊症が多いことが報告されており、その原因としてコルヒチンの使用や精巣の血管炎が考えられている。抗HSS-A抗体が精子表面に結合するかは明らかでないが、本抗体の存在が不妊の原因となる可能性も考えられ、今後の課題と考えられた。

E. 結論

精巣特異抗原HSS-Aに対する自己抗体はベーチェット病男性例に検出され、神経、血管ベーチェットとの関連が示唆された。本抗体の産生機序の追究はベーチェット病における病態の解明に有用と考えられた。

<引用文献>

- 1) Cervera R, Navarro M, Lopez-Soto A et al. Antibodies to endothelial cells in Behcet's disease: cell-binding heterogeneity and association with clinical activity. *Ann Rheum Dis* 1994; 53: 265-7.
- 2) Shankar S, Mohapatra B, Suri A. Cloning of a novel human testis mRNA

specifically expressed in testicular haploid germ cells, having unique palindromic sequences and encoding a leucine zipper dimerization motif. Biochem Biophys Res Commun 1997; 243: 561-5.

3) Jose LC, Norberto O, Antonio D et al. Recurrent epididymio-orchitis secondary to Behcet's disease. J Urol 1998; 160: 498.

4) Kochman RH, Ben-Chetrit E. The effect of colchicine treatment on sperm production and function: a review. Hum Reproduct 1998; 13: 360-362.

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

安岡秀剛、桑名正隆、三森経世、河上裕: 強皮症における精巣特異抗原に対する自己抗体の解析. 第3回強皮症研究会(東京). 2000. 2.

G. 知的所得件の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1 抗HSS-A抗体陽性例の臨床的特徴

	陽性 (n=4)	陰性 (n=39)
アフトタ性口内炎	100%	100%
皮膚病変	100%	94%
陰部潰瘍	50%	64%
眼病変	50%	44%
腸管ベーチェット	25%	20%
神経ベーチェット	50%	13%
血管ベーチェット	25%	10%

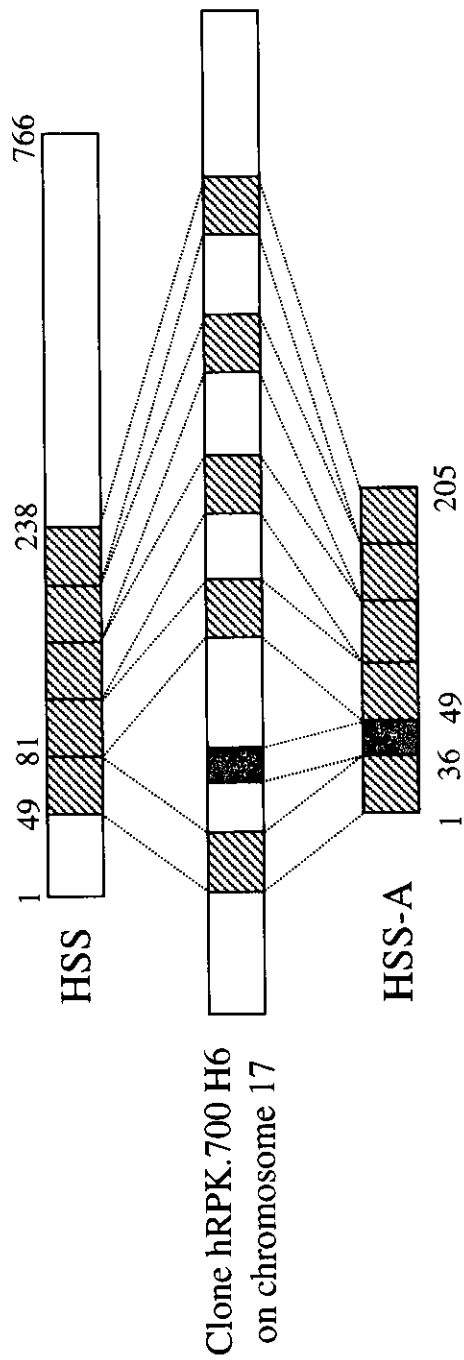


図1 HSSおよびHSS-Aの塩基配列の相同性

HSS-Aの塩基配列は黒で示した42bpの挿入部分を除いて、HSSと一致していた。HSSおよびHSS-Aの塩基配列は、17番染色体上に存在するhRPK 700 H6にコードされていることから、HSS-AはHSSのalternative splicingによる産物と考えられた。HSS、HSS-A上の数字はアミノ酸残基を示す。

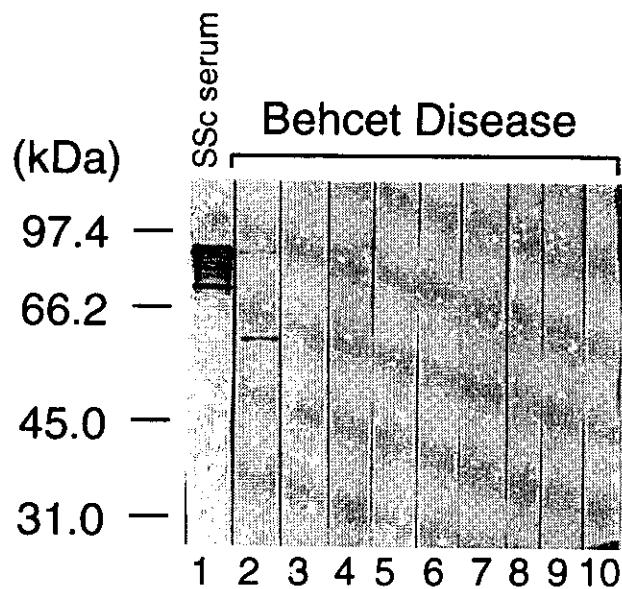


図2 HSS-A融合蛋白を抗原とした免疫ブロットによる抗HSS-A抗体の検出

レーン1は陽性コントロールとして用いた強皮症患者血清、レーン2~10はベーチェット患者血清。レーン2~5は約80kDaのHSS-A融合蛋白と反応し、抗HSS-A抗体陽性であった。

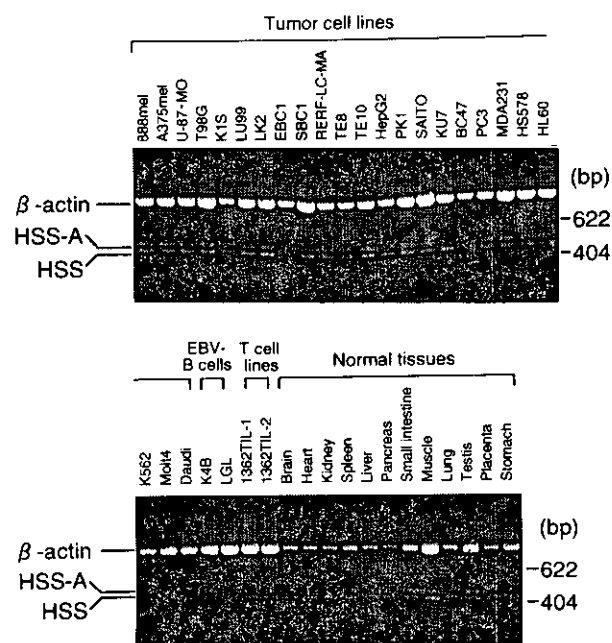


図3 培養細胞および正常組織におけるHSSおよびHSS-AのmRNA発現の検出

24種類の腫瘍細胞株、2種類のEBVトランスフォームB細胞株、2種類のT細胞株および正常組織(脳、心臓、腎臓、脾臓、肝臓、膵臓、小腸、骨格筋、肺、精巣、胎盤、胃)由来のRNAを用いてRT-PCRを行い、HSSおよびHSS-AのmRNAの発現を調べた。HSS-AのmRNAは正常組織では精巣にのみ高発現されていた。

ベーチェット病モデル動物を用いた免疫制御に関する研究

分担研究者	小野江和則	（北海道大学免疫科学研究所）
研究協力者	北市 伸義	（北海道大学医学部）
	小笠原一誠	（滋賀医科大学第二病理）
	小竹 聡	（北海道大学医学部）
	西平 順	（北海道大学医学部）

研究要旨 H-2A^k マウスに実験的自己免疫ブドウ膜炎（EAU）を誘導する IRBP 由来ペプチド抗原を同定した。今回このペプチドを用い、EAU を抑制する新治療法を開発した。また、EAU 発症におよぼすマクロファージ遊走阻止因子（MIF）の役割が明らかになった。

A. 研究目的

ベーチェット病は、全身病変と臓器特異的自己免疫疾患の病態を示す。我々はベーチェット病のモデル動物として供するため、ペプチド抗原による EAU をマウスとラットの系で誘導することに成功した。今回、このモデル系を用い、EAU 発症を抑制する方法を開発し、また EAU 発症に関わる MIF の役割を解明することを目的とした。

B. 研究方法

B10.BR マウスを IRBP 由来ペプチド抗原（K2）で免疫して EAU を誘導する系と、LEW ラットを IRBP 由来ペプチド抗原（R16）で免疫して EAU を誘導する系を用いた。B10.BR における EAU 抑制は、予めリポソーム封入 K2、またはリポソーム封入 K2 と抗 CD40L 単クローン抗体を皮下注射した後、型通り EAU を誘導する方法で検討した。T 細胞免疫応答に対する MIF の役割を明らかにするため、Th1 型 DB14、Th0 型 K2S、TCL3 クローン、または NK-T 細胞を刺激し、増殖反応中に抗 MIF 単クローン抗体を添加し、その影響を解析した。in vivo での抗 MIF 抗体の効果を解析するため、LEW ラットを抗原ペプチド（R16）で免疫し、抗 MIF

抗体を隔日腹腔内投与した。11 日目に所属リンパ節より T 細胞を回収し、抗原特異的 T 細胞増殖反応を行った。また、LEW ラットに抗 MIF 抗体を投与し、R16 免疫後の EAU 発症に対する影響を解析した。

上記の動物実験は、本研究所動物実験委員会において、「本研究所動物実験に関する指針」に沿った研究内容であることを審査され、認可を受けた。

C. 研究結果

1. リポソーム封入ペプチドと抗 CD40L 単クローン投与によるマウス EAU 制御

B10.BR マウスにリポソーム封入 K2 を皮下注射し、その後 K2 と CFA によって免疫した。10 日後に所属リンパ節より T 細胞分画を得、K2 に対する増殖反応を定量した。コントロールの PBS、またはリポソーム単独投与と比べ、リポソーム封入 K2 処理マウスでは、T 細胞反応は有意に低下していた（図 1）。また、この低下の程度は、K2 と IFA 投与群よりも著明であった。リポソーム封入 K2 と同時に抗 CD40L 単クローン抗体を投与したマウスでは、さらに強い抑制効果が見られた。

次にリポソーム封入 K2 による T 細胞増