

ベーチェット病におけるメモリーT細胞のケモカイン受容体発現

分担研究者	藤野雄次郎	東京厚生年金病院眼科
	蕪城俊克	東京大学医学部眼科
	吉田 淳	東京大学医学部眼科
	沼賀二郎	東京大学医学部眼科
	川島秀俊	東京大学医学部眼科

研究要旨 ベーチェット病患者の末梢血メモリーT細胞の細胞表面上におけるケモカイン受容体(Th1:CXCR3, CCR5; Th2:CCR4)の発現を検討した。活動期のベーチェット病患者10例、非活動期ベーチェット病患者10例およびコントロールの正常人10例から得た末梢血単核球からFlow cytometryを用いてCD4+/CD45RO+メモリーT細胞を回収し、3種類の抗ケモカイン受容体(CXCR3+, CCR5+, CCR4+)抗体を反応させ、メモリーT細胞におけるそれぞれのケモカイン受容体陽性細胞の割合を検討した。末梢血メモリーT細胞におけるCCR5+細胞の割合は、活動期ベーチェット病患者、非活動期ベーチェット病患者、正常人でそれぞれ $6.0 \pm 5.0\%$ 、 $3.0 \pm 3.2\%$ 、 $1.5 \pm 1.3\%$ であった。CXCR3+細胞は、 $46.7 \pm 7.7\%$ 、 $40.5 \pm 7.9\%$ 、 $36.9 \pm 5.7\%$ であった。それに対しCCR4+細胞は、 $28.3 \pm 5.3\%$ 、 $29.1 \pm 11.5\%$ 、 $22.8 \pm 5.2\%$ であった。活動期ベーチェット病患者ではCXCR3+ 及びCCR5+細胞の割合が正常人に比べ有意に増加していた。特にCCR5+細胞の増加は活動期ベーチェット病患者で顕著であり、末梢血中Th1細胞CCR5陽性細胞が重要な働きをしている可能性が示唆された。

A. 研究目的

ベーチェット病の眼炎症発作の原因として、末梢血リンパ球が産生するIFN- γ やTNF- α などの炎症性サイトカインが重要な働きをしている可能性が考えられている。特にTh1細胞が産生するとされるIFN- γ については、末梢血リンパ球のIFN- γ 産生が眼炎症発作時に高くなる事が報告されている^{1,2)}。また、ベーチェット病患者の皮膚病変部にはメモリーT細胞(CD4+,CD45RO+T細胞)浸潤が優位に見られる事³⁾などから、ベーチェット病の増悪には、メモリーT細胞、特にTh1(Type-1 helper T cell)細胞の炎症局所への浸潤が関

与している可能性が示唆されている。一方、白血球が血管内から炎症局所へ遊走する際、ケモカインと総称される白血球遊走、活性化因子が重要な働きをしている事が明らかとなっている⁴⁾。このケモカインに対する受容体は、CC chemokine receptor (CCR) 1-9、CXC chemokine receptor (CXCR) 1-5などが知られているが、白血球のサブタイプによって発現するケモカイン受容体が異なり、このケモカイン受容体のサブセットの違いが、白血球の炎症局所への選択的な遊走に重要であると考えられている。

ベーチェット病の増悪期には、末梢血中で

Th2細胞に比べてTh1細胞が優位となる報告^{1,2)}があることから、末梢血T細胞のケモカイン受容体発現もベーチェット病の病態に関連している可能性が考えられる。しかし、現在までにベーチェット病におけるケモカイン受容体発現を検討した報告はない。今回、末梢血T細胞におけるTh1, Th2細胞遊走に關与するケモカイン受容体の発現とベーチェット病の病勢との関連性を調べる目的で、末梢血中のメモリーT細胞(CD4+, CD45RO+ヘルパーT細胞⁵⁾)表面に発現するケモカイン受容体についての解析を行った。

B. 研究方法

対象は東京大学医学部付属病院眼科に通院中のベーチェット病患者15例(年齢 48.0 ± 9.3 才、男性10例女性5例)である。患者に検査の趣旨を充分説明し文書で同意を得た。強い眼発作を起こしてから1週間以内の活動性の高い時期(活動期群: 10例)と眼炎症後1ヶ月以上経過した非活動性の時期(非活動期群: 10例)に末梢血10mlを採取した。一方、コントロールとして健常人(健常人群: 10例、年齢 37.3 ± 9.2 才)から同様に採血した。採血時に、一般血液検査(血球数、白血球分画、血液沈降速度、C反応性蛋白)も行った。

メモリーT細胞におけるケモカイン受容体の発現は、以下の方法で行った。まずFicoll遠心分離法で単核球を抽出し、さらにphycoerythrin標識抗CD4抗体とallophycocyanin標識抗CD45RO抗体を1時間反応させた後、メモリーT細胞(CD4+, CD45RO+ヘルパーT細胞)をFACSでsortingにより抽出した。さらに、メモリーT細胞の細胞表面上におけるケモカイン受容体(Th1: CXCR3, CCR5; Th2: CCR4)について発現率を調べる目的で、メモリーT細胞にFITC標識抗CXCR3抗体、抗CCR5抗体、抗CCR4抗体を反応させた後、FITC陽性細胞率をFACSで調べた。FACSによるsortingの

結果およびFITC陽性細胞率の解析結果の3例を図1に示す。

C. 研究結果

採血した時点での血液中の白血球数、赤血球沈降速度、C反応性蛋白の値は、活動期および非活動期のベーチェット病患者で健常人群に比べ赤血球沈降速度が有意に高い他は有意差はなかった。

メモリーT細胞数は、活動性、非活動性のベーチェット病患者および健常人ともに約3~4万個/mlで有意差は認めなかった。また、末梢血単核球に占めるメモリーT細胞の割合も同様に3群間で有意差を認めなかった。

活動性ベーチェット病患者、非活動性ベーチェット病患者、健常人における末梢血メモリーT細胞のCXCR3発現率は、各群でそれぞれ $46.7 \pm 7.7\%$ 、 $40.5 \pm 7.9\%$ 、 $36.9 \pm 5.7\%$ であった。またCCR5陽性率は、それぞれ $6.0 \pm 5.0\%$ 、 $3.0 \pm 3.2\%$ 、 $1.5 \pm 1.3\%$ であった。活動性ベーチェット病患者では健常人と比べCXCR3+及びCCR5+細胞の割合が、有意に増加していた(Mann-Whitney's U test、 $p < 0.05$)。それに対し、CCR4+細胞の割合は、それぞれ $28.3 \pm 5.3\%$ 、 $29.1 \pm 11.5\%$ 、 $22.8 \pm 5.2\%$ で有意差は認めなかった(図2)。以上の結果から、活動性のベーチェット病患者の末梢血メモリーT細胞は、健常人と比べCXCR3、CCR5陽性率が有意に増加している事が明らかとなった。特にCCR5は健常人ではその発現率が非常に低い(1-2%)のに対し、活動性ベーチェット病患者群では明らかな増加が認められた。

D. 考察

これまでに我々は、ベーチェット病患者の末梢血中において2種類のケモカイン(IL-8、MCP-1)の濃度が健常人と比べ有意に増加している事を報告した⁷⁾。今回は活動性ベーチェット病患者では、末梢血T細胞表面に発現するケモカイン受容体CXCR3、CCR5の発現率が

健常人に比べ有意に増加している事を明らかにした。CXCR3、CCR5はTh1細胞に特異的に発現するケモカイン受容体であるとされている事から、この結果はベーチェット病の増悪期には、末梢血中でTh2細胞に比べてTh1細胞が優位となる報告^{1,2)}と矛盾しない結果であると考えられる。

また、CXCR3又はCCR5を発現するT細胞が、慢性関節リウマチの関節液中⁸⁾で増加している事、多発性硬化症の末梢血中で増加し⁹⁾、髄液内に検出される事¹⁰⁾などが報告されており、これらの疾患の炎症にCXCR3またはCCR5を発現したTh1細胞が重要な役割を担っている事が示唆されている。CXCR3陽性T細胞とCCR5陽性T細胞の違いについてはこれまでに十分な検討をした報告はないが、両方を同時に発現するT細胞も存在するらしい。今回の検討で、末梢血メモリーT細胞におけるCCR5発現率は健常人では非常に低いのに対し、活動性ベーチェット病患者群では明らかな増加が認められた。この事から、CCR5陽性細胞がベーチェット病で特に重要な働きをしている可能性も考えられる。今後はCXCR3のリガンドであるinterferon-inducible protein of 10kDa (IP-10)、monokine induced by gamma-Interferon (Mig)およびCCR5のリガンドであるmacrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α)の末梢血中の濃度についても今後解析する必要があると考える。

E. 結論

活動期ベーチェット病患者の末梢血メモリーT細胞の細胞表面上におけるケモカイン受容体はCXCR3+及びCCR5+細胞の割合が正常人に比べ有意に増加している。特にCCR5+細胞の増加は顕著であり、末梢血中Th1細胞CCR5陽性細胞が重要な働きをしている可能性が示唆された。

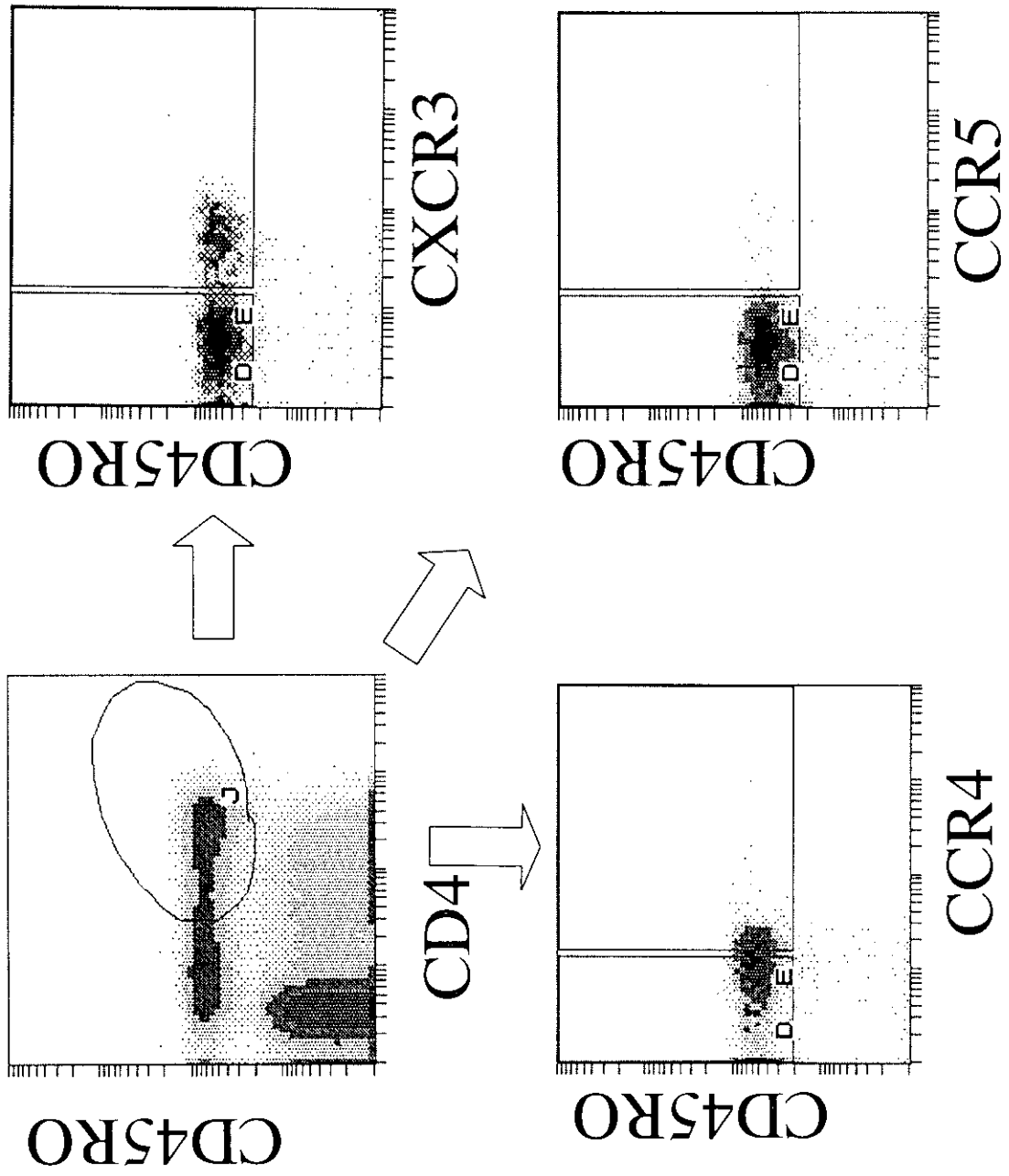
F. 文献

- 1) Raziuddin S. et al.: J. Rheumatol. 25:329-33,1998.
- 2) 大野重昭、他：厚生省特定疾患 免疫疾患調査研究班 ベーチェット病分科会 平成8年度業績集 P391-395,1997.
- 3) Gul A, et al: Br. J. Dermatol. 132: 901-7, 1995.
- 4) 松島綱治：細胞工学17: 1022-1029, 1998.
- 5) Jones RA, et al.: Immunology 70: 55-60, 1990.
- 6) Cacalano G, et al. : Science 265 (5172): 682-4, 1994.
- 7) 藤野雄次郎、他：厚生省特定疾患 免疫疾患調査研究班 ベーチェット病分科会 平成9年度業績集 P105-108,1998.
- 8) Qin S, et al.: J. Clin. Invest. 101: 746-54, 1998.
- 9) Sorensen TL, et al. : J. Clin. Invest. 103: 807-15, 1999.
- 10) Balashov KE, et al.: Proc. Nat. Acad. Sci. 96: 6873-8, 1999.

G. 研究発表

学会発表 Fujino Y, Kaburaki T, Yoshida A et al: Expression of chemokine receptors on memory T cells in Behcet's disease. ARVO 2001

図1. CD4+/CD45RO+細胞の抽出、及びケモカイン受容体発現の検討



(図1続き)

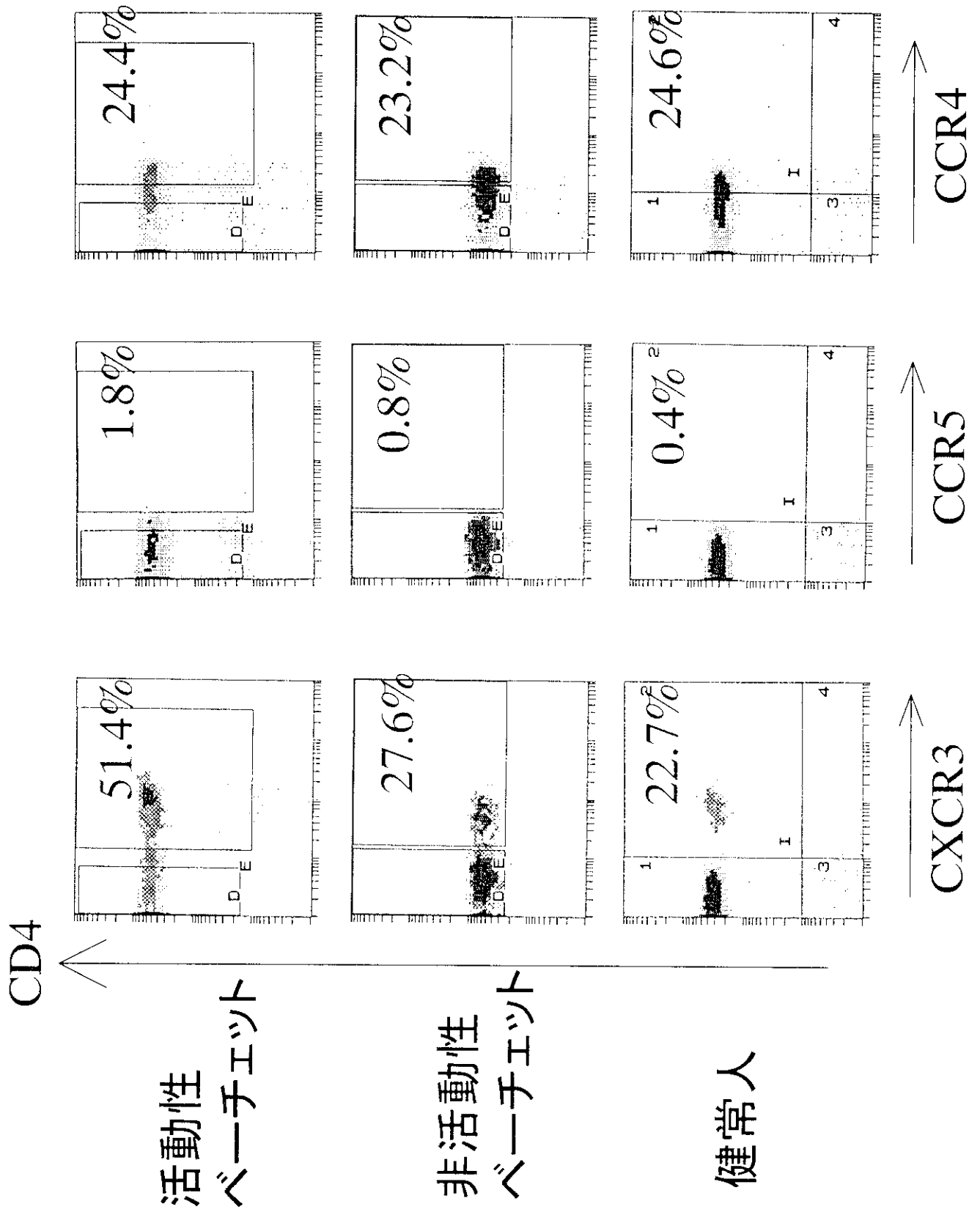
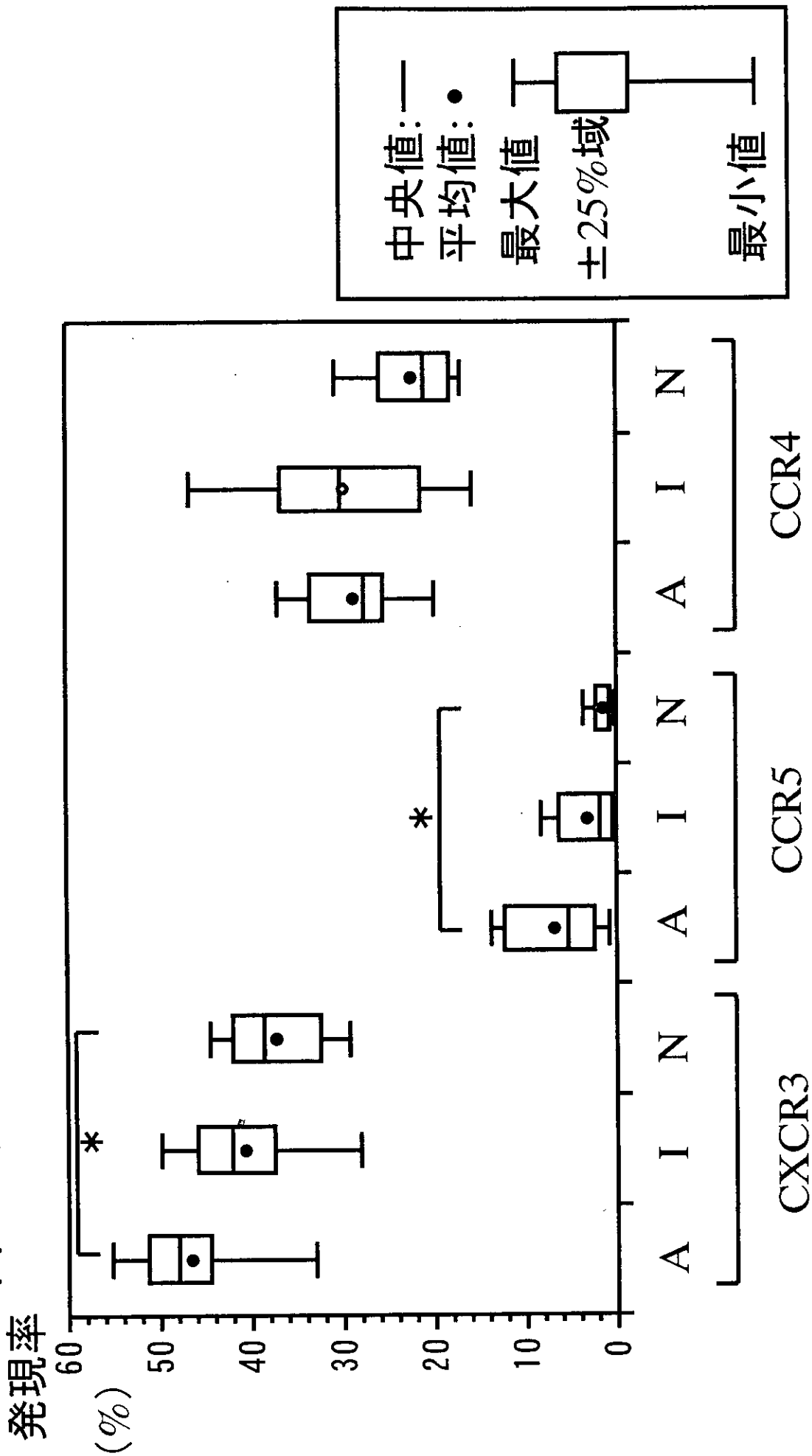


図2. 末梢血メモリーT細胞におけるケモカイン受容体発現率



(* : p<0.05, Mann-Whitney's U test)

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

ベーチェット病に関する調査研究
—ファージクローンによる IL-6 阻害分子の開発—

分担研究者 吉崎 和幸 大阪大学健康体育部健康医学第一部門、
同・大学院医学系研究科分子病態医学専攻生理病態学 教授

平成 5 年以來ベーチェット病の新しい治療法の開発を目指している。すなわち、本疾患の病態に關与する TNF α 、IL-6 を特異的に阻害する抗サイトカイン抗体による治療の欠点をなくし、利便性の高い阻害剤の開発を目指している。このため、まず IL-6 の機能阻害剤として M13 ファージライブラリーを用いて抗 IL-6 抗体に結合し、IL-6 依存性に増殖するヒト T 細胞株、KT-3 細胞の増殖を抑制するクローンを数種見出した。この阻害はヒト IL-6・ヒト IL-6 受容体系を介し、得られたクローンの 77 の基本発現アミノ酸配列は XWWKHWQ で疎水性の高い 1kd 以下の低分子ペプチドである。ペプチドのみによる阻害の有無を検討するためには合成ペプチドを作成し、増殖抑制を証明しなければならない。次にヒト抗体を用いたサイトカイン阻害剤として single chain fragment variant (scFv) を導入した抗体ファージライブラリーを用いて IL-6 に結合する scFv (H 鎖と L 鎖の可変部のみの遺伝子を結合させた異型抗体) の発現クローンを得る方法を確立した。今後、このライブラリーを用いて IL-6 結合、IL-6 機能阻害する抗体ファージクローンを検索する。

A. 研究目的

我々は平成 5 (1997) 年よりベーチェット病の病態にサイトカインの異常産生が關与していることを示し、特に TNF α の産生異常が本疾患発症の根本に位置することを *in vitro* および *in vivo* にて示してきた。また、セントコア社の開発したキメラ型抗 TNF α 抗体による大野班長を中心とした臨床治験においても有効性が示唆されている。すなわち、サイトカインの異常産生がベーチェット病の病態に直接的に關与し、産生異常の改善あるいは機能阻害による新たな治療法の開発が考えられる。

我々は IL-6 の異常産生が病態の中心と考えられるキャスルマン病、慢性関節リウマチに対して、ヒト型化抗 IL-6 受容体抗体 (MRA) による IL-6 の機能阻害が、有効な治療法になることを示している。しかし、ヒト型化とはいえマウス異種蛋白を含むため、MRA に対する抗体の出現を否定することはできず、MRA の作用低下あるいはアナフィラキシー出現の危険性も完全に除外するわけにはいかない。また、MRA は抗体で高分子 (150kd) であるため、経静脈注入を余儀なくされ、患者の利便性を著しく損なっている。さらに高額であるため経済的にも負担がかかる。

以上の障害を改善するには、より低分子で安価で経口可能な安全な IL-6 阻害剤が望まれる。このため我々はより低分子の IL-6 阻害剤として M13 ファージライブラリーを用いたペプチド開発を試み、数種の抗 IL-6 抗体結合ファージクローンを得たが、本年は選別されたクローンによる機能阻害を検討する。また、新たに single chain fragment variant (scFv) を導入したファージライブラリーを用いて、可変部のみの完全ヒト抗体の開発を目指す。

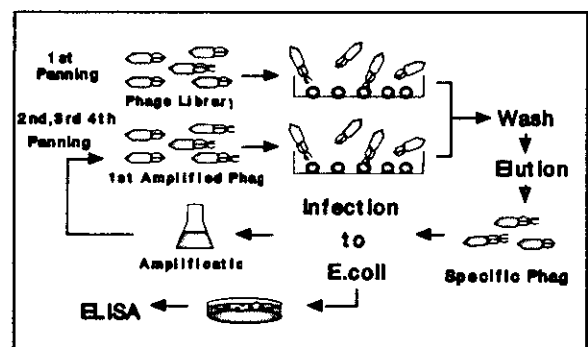
B. 研究方法

1. 抗 IL-6 抗体結合ファージクローンの選択

M13 ファージの PIII の N 末に無差別配列した 7 アミノ酸よりなるペプチドを発現するライブラリ

ーを用いてマウス抗 IL-6 抗体 (B-E8 (IgG1, DIACLONE)) をコートした 35mm のプラスチックプレートにまき、非結合ファージを洗浄後、結合したファージを 0.1M glycine-HCl Buffer (pH 9.1) で溶出した。ファージクローンを含む溶出液を直ちに Tris-HCl Buffer で中和した後、ER2537 または TG-1 宿主細胞に感染させファージを増殖させた。上記方法を 2-3 度繰り返して、抗 IL-6 抗体結合ファージクローンを得た (図 1)。

図 1. 特異的結合能を持つファージクローンの選択



2. 抗 IL-6 抗体特異結合クローンの選択

マイクロタイタープレートにそれぞれ抗体、BSA、MIP-1 α 、IgG 等を結合させ、5%ゼラチンでブロック後、抗 IL-6 抗体結合クローンを加え、非結合ファージを洗い出した後、ビオチン化抗 M13mAb を反応させ、ストレプトアビシン結合 Alk-ph を用いて発色させ、405nm の吸光で検出した。

3. ファージクローンによる IL-6 依存増殖阻害

1) IL-6 依存性マウス MH-60 細胞を用いた増殖阻害

IL-6 依存性に増殖するマウスミエローマ MH-60 細胞 (マウス IL-6 受容体を表現) にファージクローン液 (50 μ l) を加え、その後 7.5pg/ml の rhIL-6 を加えて 48 時間培養し、その増殖阻害を MTT ア

ッセイを用いて検討した。完全阻害のコントロールとして 1 μ g/ml のラット抗マウス IL-6 受容体抗体 (MR16-1) を用いた。

2) IL-6 依存性ヒト KT-3 細胞を用いた増殖阻害

IL-6 依存性ヒト KT-3 細胞 (ヒト IL-6 受容体を表現) にファージクローンを 2.5 μ g/ml、5 μ g/ml、10 μ g/ml、20 μ g/ml、40 μ g/ml 加え、その後 250pg/ml の rhIL-6 を加えて 5 日間培養し、WST-8 (同仁化学) アッセイを行い増殖抑制の有無を検討した。完全阻害のコントロールとして 10 μ g/ml のヒト型化抗 IL-6 受容体抗体 (MRA) を用いた。

4. 抗体ファージライブラリーの作成

ヒト末梢 B リンパ球から免疫グロブリンの H および L 鎖可変部遺伝子 (V_H , V_L) を PCR 法を用いて増幅し、それをファージ蛋白発現ベクター、pCANTAB 5E に無差別に挿入結合し抗体ファージライブラリーを作成した。各ファージクローンはそれぞれの V_H と V_L の組合せの蛋白としてファージの表面に発現させた。図 2 と図 3 に抗体ファージクローンライブラリーと IL-6 阻害概念図を示す。

図 2. ファージによる scFv の発現

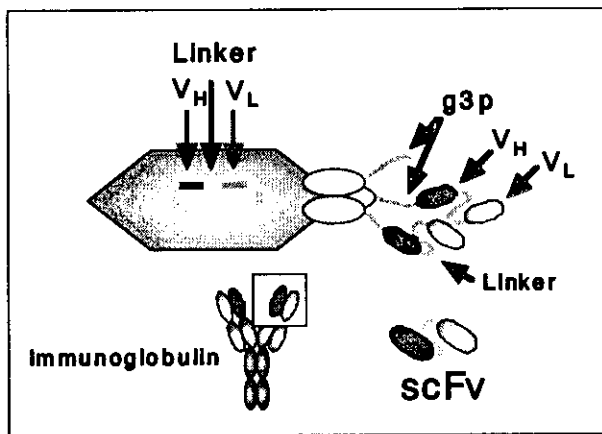
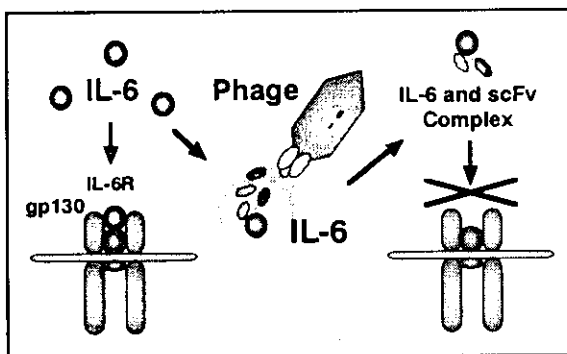


図 3. scFv による IL-6, IL-6R 間の結合阻害



5. 抗体ファージライブラリーを用いた IL-6 結合ファージクローンの選別

rhIL-6 をコートしたプラスチックプレートに M13 ファージライブラリーと同様の方法で IL-6 結合クローンを得た。IL-6 への結合特異性は IL-6 以外に、ヒトアルブミン、AB 血清、MCP-1、MIP-1 α 、ヒト IgG、ゼラチン、スキムミルク等をコートし

たマイクロプレートを用い、抗 E-Tag 抗体 (すべての V_H+V_L に E-Tag 遺伝子を結合させた) で特異結合を検出した。

6. 倫理面への配慮

本研究を行うにあたり、ファージライブラリーの作成、プラスミドの作成は鹿児島大学工学部・遺伝子組み換え実験許可施設で行われ、杉村和久先生による申請が許可されている。大阪大学健康体育部においては、すでに作成されたクローンを用いて増殖抑制実験が行われ、特に規制は受けない。その他、現在のところすべて in vitro の研究で、倫理上問題となることはないと考えられる。

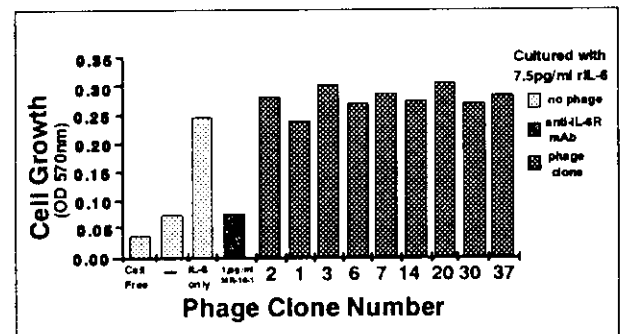
C. 研究結果

1. 抗 IL-6 抗体結合 M13 ファージクローンによる IL-6 依存性増殖細胞の増殖抑制の検討

1) マウス MH-60 細胞 (マウス IL-6 受容体を表現)

抗 IL-6 抗体に結合する 9 種のファージクローンによる 7.5pg/ml の rhIL-6 存在下での MH-60 細胞増殖阻害効果を検討したところ、図 4 に示すようにいずれのクローンも阻害効果を示さなかった。

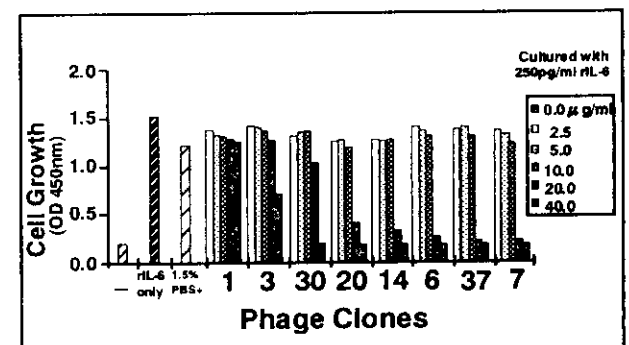
図 4. IL-6 依存マウス Cell line を用いたファージクローンによる増殖阻害実験 (ファージクローンによる顕著な増殖阻害は見られない)



2) ヒト KT-3 細胞 (ヒト IL-6 受容体を表現)

上記 1) で用いた 8 種のファージクローンを 250pg/ml の rhIL-6 存在下で KT-3 細胞と培養し、その増殖抑制効果を検討したところ、図 5 に示すように数種のクローンで濃度依存性に抑制効果が示された。特に clone #7, #37, #6, #14, #20 が強く抑制した。

図 5. ファージクローンによる IL-6 依存性ヒト細胞株、KT-3 の増殖阻害



2. IL-6 依存増殖クローンの発現ペプチド解析

システインではさんで挿入された7アミノ酸は以下の表1の配列であった。アミノ酸配列から、#7、#37、#6、#20 のペプチドは疎水性を示し、そのパターンに類似性が示された。

表1. ファージクローンの持つペプチド配列

Clone No.	CXXXXXXXXC	Hydrophilicity / Hydrophobicity Plot
#6	CXWVKHWQC	
#7	CSWVKQWQC	
#20	CVWVKHWQC	
#37	CFWVKHWQC	
#14	CDWRKHRQC	
#1	CPWVKSWQC	

3. 抗体ファージライブラリーを用いた IL-6 結合ファージクローンの選択

抗体ファージライブラリー作成後、rhIL-6 結合クローンを現在選択中で、数種のクローンが得られている。

D. 考察

抗 IL-6 抗体に結合する M13 ファージクローンを用いて IL-6 による増殖機能の抑制を 2 種類の細胞株にて検討した。2 種の細胞株はいずれもヒト IL-6 依存性に増殖するが、マウス IL-6 受容体を有するマウス MH60 に対してはすべてのクローンで増殖抑制を示さなかった。一方、ヒト IL-6 レセプターを表現するヒト KT-3 細胞に対しては一部のクローンで増殖抑制を示した。

以上の結果は、ヒト IL-6 受容体への IL-6 の結合を特異的に阻害することを示唆している。したがって得られたクローン、特に#7、#37、#6、#14、#20 クローンはヒト IL-6 受容体に結合する IL-6 抗原そのもの、あるいは立体構造上機能的に類似のペプチドを表面上に有していると考えられる。確かに表1に示したように挿入された7種のアミノ酸配列を見れば、阻害活性を示す5種のファージクローンに共通の配列を見ることができ、また各ペプチドの親水・疎水性においても比較的共通のパターンを呈している。

今後の問題としては、これらクローンによる阻害が IL-6・IL-6 受容体系に特異的であるかどうかを検討しなければならない。また、ペプチドを発現したファージ粒子を用いて IL-6 による増殖を阻害しているだけで、ペプチドによる断定できない。このためペプチドを合成し、ペプチドのみで増殖阻害の有無を検討しなければならない。

次に、抗体ファージライブラリーより IL-6 に結合する抗体 (single chain fragment variant, V_H+V_L) を発現したファージクローンを数種得たが、今後は M13 ファージクローンと同様に IL-6 依存性増殖を機能的に阻害するクローンの有無を検討する。なお、本方法によりすでに TNFα

阻害抗体 (D₂E₇、クノール社) が開発されている。

ベーチェット病の病態の中心に TNFα の異常産生が関与すると考えられている。したがって将来的には上記の方法によって TNFα 阻害分子を開発していきたい。また、IL-6 を阻害する分子も神経ベーチェットのように IL-6 の関与を示唆する疾患亜群があるので、開発する意義はあると思われる。

E. 結論

抗 IL-6 抗体に結合する M13 ファージクローンのうち数種のクローンが IL-6 依存性細胞の増殖を抑制した。それらのファージに挿入されたペプチドは共通の疎水性に富むアミノ酸配列と疎水パターンを示した。抗体ファージライブラリーを用いて IL-6 に結合するヒト抗体 (scFv) を得る方法を確立した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Atreya R, Mudter J, Finotto S, Mühlberg J, Jostock T, Wirtz S, Schütz M, Holtmann M, Schlaak JF, Lehr HA, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Galle PR, Rose-John S, Neurath MF. Blockade of IL-6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in Crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nature Medicine* 6:583-588, 2000.
2. Nishimoto N, Sasai M, Shima Y, Nakagawa M, Matsumoto T, Shirai T, Kishimoto T, Yoshizaki K. Improvement in Castleman's disease by humanized anti-interleukin-6 receptor antibody therapy. *Blood* 95:56-61, 2000.
3. Yamamoto M, Yoshizaki K, Kishimoto T, Ito H. IL-6 is required for the development of Th1 cell-mediated murine colitis. *J. Immunol* 164:4878-4882, 2000.
4. Nishioka K, Ohshima S, Umeshita-Sasai M, Yamaguchi N, Mima T, Nomura S, Murata N, Shimizu M, Miyake T, Yoshizaki K, Suemura M, Kishimoto T, Saeki Y. Enhanced expression and DNA binding activity of two CCAAT/enhancer-binding protein isoforms, C/EBPβ and C/EBPδ, in rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 43:1591-1596, 2000.
5. Nishimoto N, Kishimoto T, Yoshizaki K. Anti-IL-6 receptor antibody therapy in rheumatic disease. *Ann. Rheum. Dis* 59:121-127, 2000.

6. Mihara M, Kotoh M, Oda Y, Kumagai E, Takagi N, Tsunemi K, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Ohsugi Y, Takeda Y. Humanized antibody to human interleukin-6 receptor inhibits the development of collagen arthritis in monkeys. *Clin.Immunol*, 2001 (in press)
7. 西本憲弘, 吉崎和幸. Castleman 病と MCD-IL-6 シグナル阻害による治療. 悪性リンパ腫-疾患単位の確立と層別化治療- (平井久丸編). 東京: 医歯薬出版:p74-80, 2000.
8. 松本智成, 西本憲弘, 吉崎和幸. 慢性関節リウマチにおける抗 IL-6 レセプター療法. 炎症と免疫 8:195-198, 2000.
9. 吉崎和幸, 松本智成, 宋健, 中原英子, 奥畑聡子, 萩原圭祐, 松永奈緒, 西本憲弘. IL-6 受容体抗体の作用機序と臨床効果. 別冊最新医学「リウマチ 2000-慢性関節リウマチ病因・病態解明と治療の最前線」. 東京: 最新医学社:p167-182, 2000.
10. 西本憲弘, 吉崎和幸. 抗 IL-6 レセプター抗体. リウマチ科 23:558-562, 2000.
11. 吉崎和幸. ポストゲノム創薬・治療への方向. *BIO INDUSTRY* 18:49-55, 2001.
12. 西本憲弘, 中原英子, 吉崎和幸. ヒト型化抗 IL-6 レセプター抗体による Castleman 病の治療. *Annual Review 血液 2001* (高久史麿, 溝口秀昭, 小宮山淳, 坂田洋一, 金倉讓編). 東京: 中外医学社:p158-164, 2001.
13. 菅又泰博, 西本憲弘, 吉崎和幸. ヒト型化 IL-6 レセプター抗体による Castleman 病治療. *血液・腫瘍科* 42, 2001 (in press);
14. 杉本正道, 西本憲弘, 吉崎和幸. IL-6 と分子治療 (自己免疫疾患). *Molecular Medicine* 38, 2001 (in press).
15. 萩原圭祐, 吉崎和幸. 抗 IL-6 抗体. *Molecular Medicine* 38, 2001 (in press).

2. 学会発表

1. 西本憲弘, 松本智成, 吉崎和幸. 抗 IL-6R 抗体療法. 第 21 回日本炎症学会. 2000 年 7 月 (東京).
2. 中原英子, 西本憲弘, 松本智成, 吉崎和幸. 慢性炎症病態におけるサイトカイン依存性血管新生-IL-6はVEGFを介しCastleman病の血管新生を引き起こす-. 第 21 回日本炎症学会. 2000 年 7 月 (東京).
3. 吉崎和幸. ファージクローンによるサイトカイン結合阻害分子の開発. 厚生省特定疾患対策研究事業ベータレット病調査研究班第 1 回研究会. 2000 年 7 月 (横浜).
4. 吉崎和幸, 松本智成, 西本憲弘. ヒト型化抗 IL-6 受容体抗体の生物学的製剤としての意義. 第 28 回日本臨床免疫学会. 2000 年 9 月 (東京).
5. 西本憲弘, 岡田保典, 小幡賢一, 松本智成, 中原英子, 岸本忠三, 吉崎和幸. Reduction of serum matrix metalloproteinase-3 in rheumatoid arthritis patients following anti-IL-6 receptor antibody therapy. 第

64 回米国リウマチ学会. 2000 年 10 月 (フィラデルフィア).

6. 吉崎和幸. Pathogenic Role of IL-6 and Therapy by Blocking IL-6 Signal (IL-6 の病態意義と IL-6 のシグナル阻害による治療). 第 13 回内藤コンファレンス. 2000 年 11 月 (神奈川).
7. 中原英子, 吉崎和幸, 松本智成, 西本憲弘. Interleukin-6 may cause angiogenesis through VEGF induction in Castleman's disease. 第 42 回米国血液学会. 2000 年 12 月 (サンフランシスコ).
8. 吉崎和幸, 西本憲弘, 奥畑聡子. ファージクローンによるサイトカイン結合阻害分子の開発. 厚生省特定疾患対策研究事業ベータレット病調査研究班第 2 回研究会. 2001 年 1 月 (横浜).

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

申請を予定している。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生科学研究費補助金（特定疾患調査研究事業）
分担報告研究

ベーチェット病患者 NK 細胞の KIR の発現

分担研究者	岳野光洋	（聖マリアンナ医大	免疫学・病害動物学）
共同研究者	永渕裕子	（聖マリアンナ医大	難病治療研究センター）
	鈴木 登	（聖マリアンナ医大	免疫学・病害動物学）
	坂根 剛	（聖マリアンナ医大	免疫学・病害動物学）

ベーチェット病の病態における NK 細胞の役割は十分明らかにされていない。本年度我々は NK 細胞の機能を調節する killer inhibitory receptor (KIR) の発現を CD94、CD158a、CD158b、NKB1 に対するモノクローナル抗体を用いフローサイトメトリーにより解析し、B 病患者 40 例中 11 例に NK 細胞の CD158a(KIR2DL1) あるいは NKB1(KIR3DL1) の発現が選択的に低下していることを見出した。この 11 例はすべて眼症状あるいは神経症状、腸管症状を有する重症例で、KIR 関連遺伝子の存在様式、mRNA の発現には異常はなかった。このことは B 病患者における NK 細胞の KIR の選択的発現低下が NK 細胞の機能調節に変調をきたし、B 病活動性病態の形成に寄与している可能性を示唆している。

A. 研究目的

ベーチェット病 (B 病) では NK 細胞の数的増多が報告される一方で、活動期の NK 細胞活性の低下も指摘されており、病態における NK 細胞の役割は十分明らかでない。NK 細胞の機能は MHC クラス I 分子をリガンドとして認識し、細胞内に抑制性のシグナルを伝達する killer inhibitory receptor (KIR) を介して制御されている。個々の NK 細胞は複数の KIR を任意に組合せて発現しているので、NK 細胞全体としての機能は複雑な制御系に支配されている。本年度我々は NK 細胞における KIR の発現を解析し、B 病の病態

における NK 細胞の役割を検討した。また、B 病の疾患マーカーともいえる HLA-B51 は HLA-Bw4 に属し、NKB1 (KIR3DL1) のリガンドとして機能することから、リガンドである HLA-B51 の存在と NKB1 の発現の関連についても若干の検討を加えた。

B. 研究方法

① 対象：B 病患者 40 例（男性 17 例、女性 23 例、平均年齢 46.3±11.5 才）。眼症状を有する患者は 25 例で、特殊病型の患者は神経型 5 例、腸管型 3 例で、6 例は臨床的に活動期にあった。なお、健常者 23 名を対照とした。

② NK 細胞の KIR の発現：末梢血単核細胞を CD56 と KIR (CD94、CD158a、CD158b、NKB1) に対するモノクローナル抗体を用いて二重染色し、フローサイトメトリーにより解析した。

③ KIR 遺伝子の解析：ゲノムにおける KIR 関連遺伝子 (KIR2DL1-3、KIR3L1、2、NKG2a) の存在を PCR 法により検索した。今回検索した細胞表面に発現する分子とこれらの遺伝子の関係は表 1 の通りである。

④ KIR mRNA の発現の解析：末梢血単核細胞における KIR 関連遺伝子の mRNA の発現を RT-PCR 法により解析した。

⑤ HLA-B の解析：HLA-Bw4、Bw6 の有無は PCR 法により決定した。

(倫理面への配慮)

すべての血液供給者に対し、研究の目的、使用法を説明し、同意を得た上で採血を行なった。また、プライバシーの保護のため、得られたデータは第三者に漏れないよう厳重に管理した。

C. 研究結果

① NK 細胞の頻度：末梢血単核細胞中の CD3-CD56+細胞の頻度をフローサイトメトリーで解析した。一部の B 病患者で 40%を越える NK 細胞増多が見られたがばらつきが大きく、B 病患者全体としては健常者と有意差はなく、活動性、特殊病型との関連も認めなかった (B 病患者 13.5±11.2%、健常者 14.6±7.3%、NS)。

② NK 細胞における KIR の発現：CD56 陽性 NK 細胞上の CD94、CD158a、

CD158b、NKB1 の発現に関して、B 病患者全体としては健常者と有意差は認めなかった (図 1、表 2)。しかし、患者では 40 例中 11 例で CD158a あるいは NKB1 が選択的な減少が観察された (表 2)。この 11 例中 10 例は眼症状を有し、中枢神経障害が 2 例、腸管型が 1 例であった。逆に眼症状を呈する 25 例のうち 10 例に KIR の選択的減少が見られたのに対し、眼症状のない 15 例では腸管型の 1 例にすぎなかった (patient #2)。この症例は半年の期間においても末梢血中 CD56 陽性細胞の頻度にほとんど変化なく、各 KIR の発現率もほとんど同じであった。この検索時の疾患活動性はともに寛解期にあった。

また、KIR の発現と疾患活動性との明らかな関連は見出せなかった。

③ KIR 関連遺伝子および mRNA の発現：患者および健常者のゲノム DNA を用いて PCR 法により KIR 関連遺伝子を解析した結果、これまでの東アジア人の成績と一致し、KIR2DL2 が欠損していた (図 2)。また、フローサイトメトリー上の CD158a、NKB1 の選択低下例も含め、KIR2DL2 以外のすべての mRNA の発現が確認された (図 2)。

④ NKB1 と HLA-Bw4 の関連

NKB1 のリガンドである HLA-Bw4 の有無は NKB1 の発現に影響する因子ではなく、HLA-Bw4 の有無のいかんによらず B 病患者だけに NKB1 の発現低下例がみられた (表 3)。

D. 考察

本研究で、重症病型の一部の B 病患者では NK 細胞の KIR 発現が選択に低下していることが明らかになった。ヒトにおいて個々の NK 細胞は 1 から 5 個以上の KIR を発現し、それぞれに対応する HLA-クラス I 分子により機能制御を受けている。個体の中の NK 細胞が特定の KIR の発現を欠くと、そのリガンドにより本来抑制されるべき NK 細胞の機能が制御不能となり、何らかの病的変化を惹起する可能性は十分考えられる。

また、KIR の発現パターンは NK 細胞を機能的なサブセットに分類する。この観点から、一部の B 病患者では明らかに NK 細胞サブセットのバランスに異常があると考えられる。表 2 の patient#1、#2 は末梢血単核細胞中の NK 細胞比率が 40% を越える明らかな NK 細胞増多例であるが、それぞれ NKB1 あるいは CD158a が選択的に低下していた。このことはこれらの患者における NK 細胞の増多が NK 細胞としてポリクローナルな形で生じているのではなく、KIR の発現に規定される一定の NK 細胞サブセットが増多していることを示唆している。

次に KIR の発現をそのリガンドである HLA-クラス I 分子から検討した。NKB1 のリガンドは HLA-Bw4 であり、B 病の疾患感受性因子である HLA-B51 も含んでいる。しかし、生体内に HLA-Bw4 の有無は特に NKB1 の発現を規定する因子ではなかった (表 3)。少なくとも今回の検討が B 病における HLA-B51 の役割を NK 細胞の KIR の発現と関連づ

け説明できる所見はなかった。

E. 結論

眼症状、神経症状、腸管症状など重症型の B 病患者では NK 細胞における選択的な KIR 発現低下が高率に検出される。この所見は KIR 発現低下に伴う NK 細胞の機能制御不全と NK 細胞サブセットの偏りが B 病の病態形成に寄与することを示唆している。

F. 健康危機情報

特記事項なし

G. 研究発表

本報告書「ベーチェット病患者 T 細胞の IL-12 受容体の発現」(聖マリアンナ医大 免疫学・病害動物学 岳野光洋他) を参照。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記事項なし

表1 本研究で検索したKIR

CD/molecule	gene	ligand	structure
CD158a	KIR2DL1	HLA-C group 2	2Ig supergene family
CD158b	KIR2DL2	HLA-C group 1	2Ig supergene family
CD158b	KIR2DL3	HLA-C group 1	2Ig supergene family
—	KIR2DL4	?	2Ig supergene family
NKB1	KIR3DL1	HLA-Bw4	3Ig supergene family
—	KIR3DL2	HLA-A?	3Ig supergene family
CD94 associated molecule	NKG2a	HLA-E	Ctype lectine

表2 ベーチェット病患者NK細胞におけるKIRの選択的減少

	CD56/PBL (%)	CD94/CD56 (%)	CD94/CD57 (%)	CD94/CD58 (%)	CD94/CD59 (%)	eye	organ
Normal	14.6± 7.3	64.3±13.8	18.4± 6.9	37.8±19.2	16.5± 6.4		
BD (mean±SD)	13.5±11.2	56.3±15.9	14.5±11.9	37.1±17.7	13.0±12.7		
Patient #1	50.7	78.7	40.2	21.1	0.1	+	
#2-1	44.0	58.2	3.9	27.9	11.3	-	GI
#2-2	43.6	55.6	2.2	32.1	11.6	+	
#3	30.5	79.3	2.2	77.5	54.0	+	CNS
#4	24.6	84.0	6.8	75.2	2.6	+	
#5	21.1	76.3	16.5	64.0	1.7	+	
#6	18.7	41.2	34.1	45.3	0.1	+	
#7	12.8	66.9	19.7	34.3	0.6	+	CNS
#8	10.8	43.2	0.9	32.1	32.1	+	
#9	7.8	65.2	3.8	36.6	6.3	+	
#10	4.1	37.5	0.1	37.9	3.2	+	
#11	3.9	33.1	6.8	22.0	2.7	+	

表3 HLA-Bw 4 とNKB1と発現

NKB/CD56	HLA-Bw4(+)		HLA-Bw4(-)	
	control (n=8)	BD (n=21)	control (n=8)	BD (n=12)
<5%	0	6	0	2
5-10%	0	7	3	4
>10%	8	8	5	6
mean±SD	19.7± 7.2	12.3±11.0	13.8± 4.8	15.5±15.0

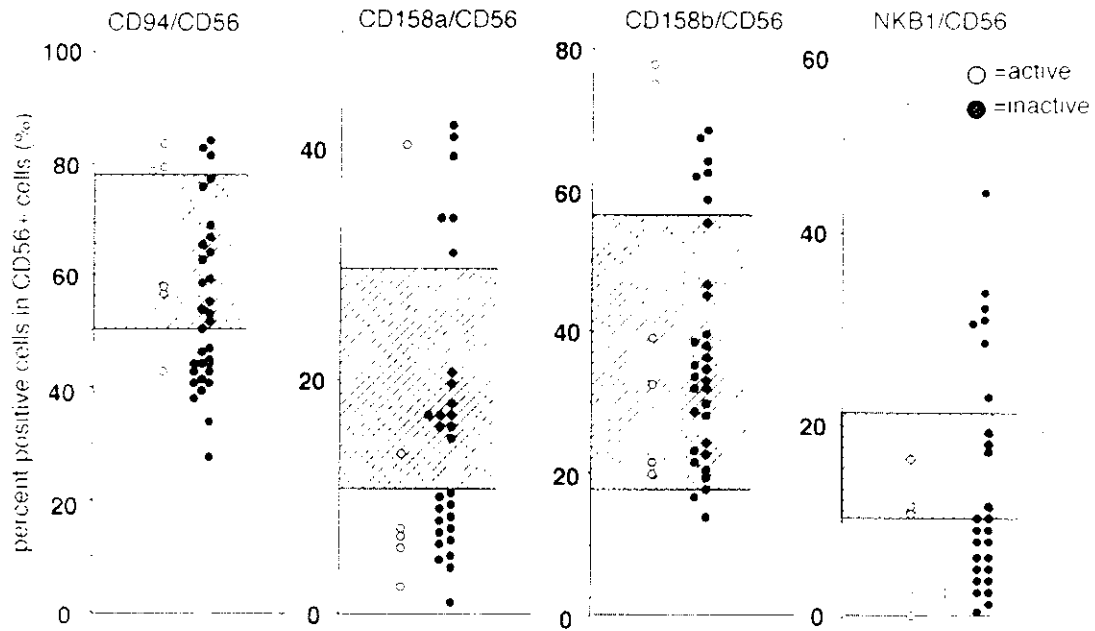
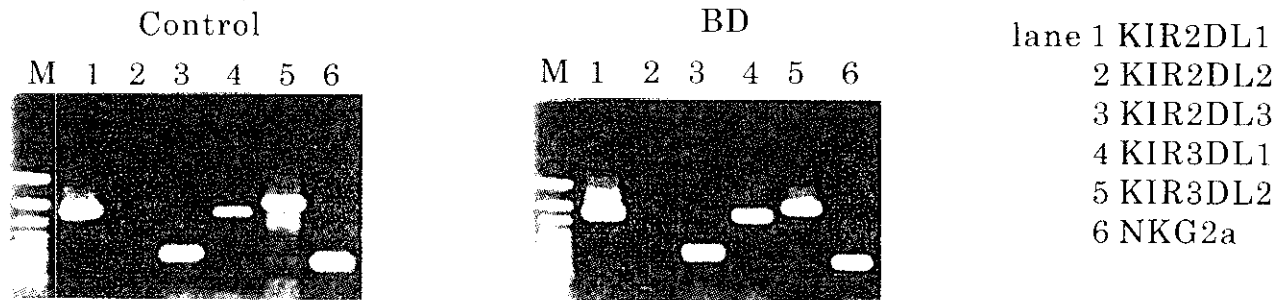


図1 ベーチェット病患者末梢血NK細胞のKIR発現頻度

A. KIR genes in genomic DNA



B. KIR gene expression in PBMC

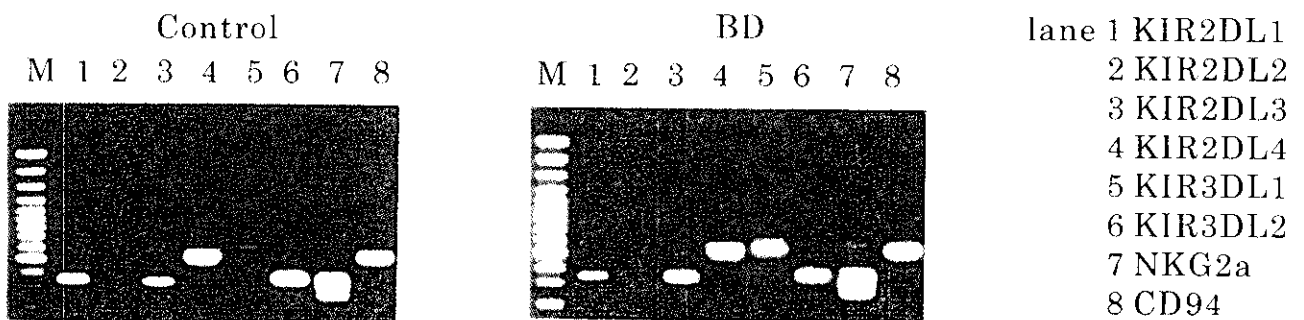


図2 ベーチェット病患者におけるKIR関連遺伝子とその発現

ベーチェット病患者 T 細胞の IL-12 受容体の発現

分担研究者	岳野光洋	（聖マリアンナ医大 免疫学・病害動物学）
共同研究者	永淵裕子	（聖マリアンナ医大 難病治療研究センター）
	鈴木 登	（聖マリアンナ医大 免疫学・病害動物学）
	坂根 剛	（聖マリアンナ医大 免疫学・病害動物学）

ベーチェット病の病変形成には Th1 型サイトカインおよび炎症性サイトカインの産生が重要な役割を果たしている。今回、我々は Th1 型免疫応答の中核をなす IL-12 に対する受容体の発現を検討し、活動期ベーチェット病患者末梢血 T 細胞は IFN- γ 産生能の亢進と相関して、IL-12 受容体を過剰に発現していることを見出した。このことは、IL-12 受容体の発現がベーチェット病の疾患活動性を反映する簡便な臨床指標としての有用性を示唆している。

A. 研究目的

ベーチェット病（B 病）の病変形成には Th1 型サイトカインおよび炎症性サイトカインが重要な役割を果たしている。我々もこれまでに B 病患者、特に活動性患者の末梢血単核細胞は hsp60 由来ペプチドに強く反応し、IL-12、IFN- γ 、TNF- α を多量に産生することを見出した。特に IL-12 は Th1 型サイトカイン産生を先導するサイトカインであり、急性期の病態形成に中枢的な役割を果たしていることが他のグループからも報告されている。さらに、IL-12 受容体（IL-12R） β 2 鎖が Th1 型細胞に選択的に発現することからも、IL-12R の発現を解析することは B 病の免疫異常を検討する上で重要であると考えられる。そこで、本年度は B 病患者末梢血 T 細胞におけ

る IL-12R の発現と Th1・Th2 型サイトカイン産生性、疾患活動性との関連を検討した。

B. 研究方法

① 対象：B 病患者 10 例（男性 3 例、女性 7 例、年齢 43.8 \pm 15.3 才）、活動期・非活動期は各 5 例ずつ、神経型 3 例、腸管型 1 例を含んでいた。健常者 9 例、慢性関節リウマチ（RA）患者 7 例を対照群とした。

② IL-12R の発現：IL-12 受容体の conformational epitope を認識するモノクローナル抗体（mAb）TOS（Pharmingen）を用いて CD3、CD4 に対する mAb との二重染色を行い、フローサイトメトリーで解析した。

③ IL-12R β 2 鎖、T-bet の発現：RT-PCR 法により検討した。

④ サイトカイン産生性の測定：末梢血単核細胞より CD3 陽性細胞を autoMACS を用いて回収し (CD3>95%)、PHA および PMA で刺激し、24 時間後に培養上清中の IFN- γ 、IL-4、IL-13 の産生量を ELISA を用いて測定した。

(倫理面への配慮)

すべての血液供給者に対し、研究の目的、使用法を説明し、同意を得た上で採血を行なった。また、プライバシーの保護のため、得られたデータは第三者に漏れないよう厳重に管理した。

C. 研究結果

① TOS で認識される IL-12R 陽性細胞の特性：本研究で用いた mAb TOS で認識されるサブセットの機能を検討するため、健常者 CD4 陽性細胞を IL-12R 陽性細胞と陰性細胞に分画して解析した。限界希釈 RT-PCR 法で半定量的に解析したところ、Th1 型のマーカーとされる IL-12R β 2 鎖、Th1 型特異的転写因子 T-bet の mRNA はいずれも IL-12R 陽性細胞のみに検出された(図 1)。また IL-12R 陽性細胞は陰性細胞と比較していずれのサイトカインの多量に産生したが、特に IFN- γ で顕著であった。

② B 病患者 T 細胞における IL-12R の発現：末梢血 CD3 陽性細胞あるいは CD4 陽性細胞における IL-12R の発現を検討した結果、B 病活動期患者では B 病非活動期患者、RA 患者、健常者に比し、その発現が著明に亢進していた(図 2、3)。これに対して T 細胞の活性化マーカーとされる IL-2R α (CD25)

の発現は各群間ほとんど差異がなかった。

③ B 病患者 T 細胞のサイトカイン産生性：活動期 B 病患者の末梢血 T 細胞の IFN- γ 産生は他のいずれの群より高値であった。また、Th2 型の IL-4、IL-13 の産生は健常者および非活動期 B 病患者より亢進し、RA 患者と同等であった(図 4)。IL-12R との発現と各サイトカイン産生性の関連を検討したところ、IFN- γ との間に最も強い相関があり、IL-4 とも弱いながら相関が認められたが、IL-13 との相関はなかった。

D. 考察

今回は各群の対象患者数が 5-9 例にすぎず、preliminary な結果ではあるが、IL-12R の発現に関して非常に興味深い所見が得られた。活動期 B 病患者 T 細胞は IL-12R を過剰に発現し、IFN- γ をはじめとしたサイトカインを多量に産生したが、非活動性患者ではこれらの所見が全く消失していた。IL-12R は T 細胞の活性化により発現が誘導される点では IL-2R α 鎖 (CD25) と共通性があるが、CD25 の発現は疾患活動性と無関係であった。このことは活動期 B 病患者 T 細胞における IL-12R の増強は単なる活性化を反映したものではないことを示唆している。

疾患コントロールである RA では IL-12R 発現増強はなく、IL-4、IL-13 の産生は健常者より亢進していたが、IFN- γ 産生亢進は認めなかった。また、IL-12R の発現とサイトカイン産生性

の関連をみても IFN- γ との相関が最も強かった。健常者 CD4 陽性細胞を用いた検討でも TOS で認識される IL-12R 陽性細胞は IL-12R β 2 鎖、T-bet を強く発現し、IFN- γ を多量に産生するなど Th1 型細胞としての性格を備えていた。Th2 型サイトカインである IL-4、IL-13 の産生も IL-12R 陰性 CD4 陽性細胞より高かったことから、この mAb で認識される IL-12R を Th1 型細胞の選択的マーカーと考えることはできないが、IL-12R 陽性細胞分画は Th1 型細胞を包含していると想定される。B 病では IL-12R 陽性細胞の増加と疾患活動性が強く相関することから、この分画の細胞が病態形成に重要ではないかと推察される。IL-12R の検出はサイトカイン産生能を検討するよりはるかに簡便であり、疾患活動性のマーカーとなりうることも期待される。今後、症例ごとに経時的に観察し、IL-12R の疾患活動性マーカーとしての妥当性を検証していく予定である。

E. 結論

活動性 B 病患者末梢血 T 細胞は IL-12R の発現が亢進し、IFN- γ をはじめとしたサイトカイン産生能も亢進しており、病態に強く関連すると考えられた。このことから、IL-12R の発現は疾患活動性のマーカーとして有用と考えられた。

F. 健康危機情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

英文著書 (book)

1) Sakane, T. and Takeno, M.: Behçet's disease-Etiopathology: immunological aspects. The Clinical Understanding of Behçet's disease (Ed. by S Lee, D. Bang and E. S. Lee), Springer-Verlag, Germany (in press)

2) Takeno M, Shimoyama Y, and Sakane T: Spontaneous production of cytokines by neutrophils from patients with Behçet's disease. The proceedings of 8th and 9th International Conference on Behçet's disease. (in press)

3) Takeno M, Shimoyama Y, Nagafuchi H, Suzuki, N, and Sakane T: Neutrophil hyperactivity in Behçet's disease. Proceeding of Ettal-Workshop, Immunology of Behçet's disease. (in press)

4) Suzuki N, Nagafuchi H, Takeba Y, Takeno M, and Sakane T: Autoimmunity in Behçet's disease. Proceeding of Ettal-Workshop, Immunology of Behçet's disease. (in press)

英文論文

1) Sakane, T., Takeno, M., and Suzuki, N.: Behçet's disease. N. Engl. J. Med., 342(8) :588-589, 2000.

2) Sakane, T. and Takeno, M.: Current therapy in Behçet's disease.

- Skin Therapy Lett. 5(6):3-5, 2000.
- 3) Sakane, T. and Takeno, M.: Interferon therapy in Behçet's disease. Internal Med. 39(8):604-605, 2000.
 - 4) Sakane, T. and Takeno, M.: Novel approaches to Behçet's disease. Expert Opin. Invest. Drugs 9(9):1993-2005, 2000
 - 5) Takeno, M. and Sakane, T.: Vascular involvement in Behçet's disease. Internal Med. 40(1):3-4, 2001

和文著書

- 1) 坂根剛、岳野光洋：Behçet(ベーチェット)病の診断と治療. year note 2001 別冊 SELECTED ARTICLE (岡庭豊編)、メディックメディア、東京、pp.881-897, 2000.
- 2) 坂根剛、岳野光洋：ベーチェット病. リウマチナビゲーター(山本一彦編)、メディカルレビュー、東京、(印刷中)
- 3) 坂根剛、岳野光洋：Behçet 病. リウマチ類縁疾患. NEWMOOK 整形外科 (越智編)、金原出版、東京、(印刷中)
- 4) 坂根剛、岳野光洋：ベーチェット病. 看護のための最新医学講座(編)、中山書店、東京、(印刷中)

和文総説

- 1) 坂根剛、岳野光洋：リウマチ性疾患—免疫と炎症とその制御、リウマチ性疾患最新の知見. Behçet 病. 内科

- 86:342-346, 2000
- 2) 坂根剛、岳野光洋：Behçet 病. 免疫症候群、日本臨床 (2000 年別冊): 361-364, 2000
- 3) 岳野光洋：内科学からみたベーチェット病. 難病と在宅ケア 16:13-17, 2000
- 4) 岳野光洋：病因 T 細胞エピトープと疾患の発症機構. ベーチェット病. 臨床免疫 (印刷中)

2. 学会発表

- 1) Takeno M, Nagafuchi H, Takeba Y, Suzuki N, and Sakane T. The pathogenic role of autoreactive T cells specific for the human heat shock protein 60 kD-derived peptides in Behçet's disease. American College of Rheumatology, 64th Annual Scientific Meeting, October, 2000, Philadelphia (USA)
- 2) 岳野光洋、永渕裕子、鈴木登、坂根剛：ベーチェット病の病態—免疫異常. 第 28 回日本臨床免疫学会総会ワークショップ. 2000 年 9 月、東京
- 3) 岳野光洋、永渕裕子、溝口昌子、坂根剛：ベーチェット病における抗ストレス蛋白(HSP)免疫応答. 日本免疫学会総会・学術集会. 2000 年 11 月、仙台

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記事項なし

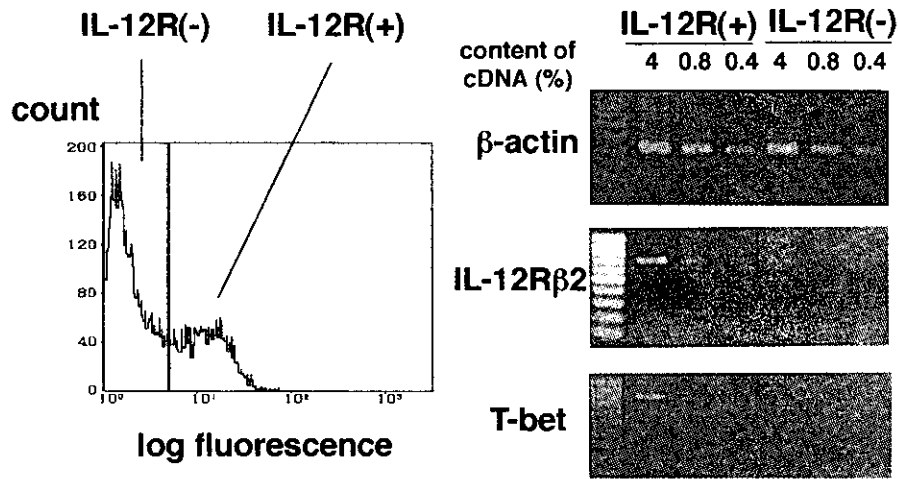


図1 抗IL-12受容体モノクローナル抗体 (TOS) に認識されるCD4陽性細胞

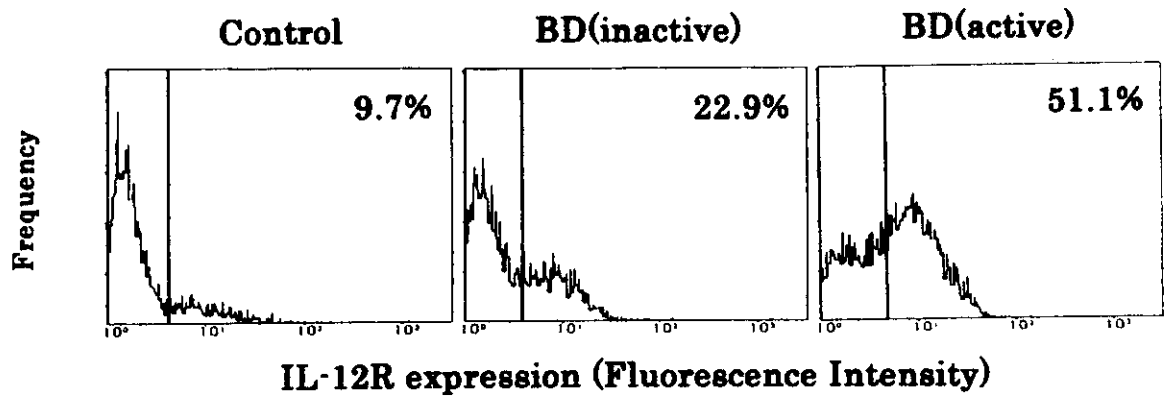


図2 抗IL-12受容体モノクローナル抗体 (TOS) に認識されるCD4陽性細胞

