

厚生労働科学研究費補助金

感覚器障害研究事業業

難治性内眼炎の発症機序解明と
新しい免疫治療に関する研究

平成14年度 総括研究報告書

主任研究者 大野重昭

平成15(2003)年 3月

目次

I. 班員名簿

II. 総括研究報告

III. 分担研究報告

1. 『顆粒球吸着カラムによるベーチェット病の治療に関する研究』

主任研究者 大野重昭（北海道大学大学院医学研究科視覚器病学分野）

2. 『アスタキサンチンの抗炎症作用に関する研究』

主任研究者 大野重昭（北海道大学大学院医学研究科視覚器病学分野）

3. 『糖尿病性網膜症に伴う網膜前膜における NF- κ B p50 の発現』

主任研究者 大野重昭（北海道大学大学院医学研究科視覚器病学分野）

4. 『ヒト MCP-1 トランスジェニックマウスにおける実験的ぶどう膜発症の増強と LPS 高感受性の関連について』

分担研究者 小野江和則

（北海道大学遺伝子病制御研究所病態研究部門免疫応答分野）

5. 『難治性内眼炎の発症機序解明と新しい免疫治療に関する研究』

分担研究者 石橋 輝雄（北海道大学大学院医学研究科分子医化学分野）

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

I. 班員名簿

<区分>	<氏名>	<所属>	<役職>
主任研究者	大野 重昭	北海道大学大学院医学研究科 視覚器病学分野	教授
分担研究者	小野江 和則	北海道大学遺伝子病制御研究所 免疫応答分野	教授
	石橋 輝雄	北海道大学大学院医学研究科 分子生化学分野	教授
リサーチレジデント	原田 知加子	東京医科歯科大学難治疾患研究所 分子神経科学	専攻生

事務局

〒060-8638 札幌市北区北15条西7丁目
 北海道大学大学院医学研究科視覚器病学分野内
 TEL: (011)706-5944 直通
 FAX: (011)736-0952

II. 総括研究報告

厚生科学研究費補助金感覚器障害研究事業総括研究報告書

研究課題名

難治性内眼炎の発症機序解明と新しい免疫治療に関する研究

主任研究者

大野 重昭 北海道大学大学院医学研究科 視覚器病学分野

分担研究者

小野江 和則 北海道大学遺伝子病制御研究所 免疫応答分野

石橋 輝雄 北海道大学大学院医学研究科 分子生化学分野

I. 研究目的

視覚障害をきたす疾患は数多くあるが、内眼炎は突然発症し視力低下をきたす疾患であり、中には失明に至る症例もある。しかしその病態は複雑であり、まだまだ解明には至っていない。我々は内眼炎の発症機序解明、および新たな治療の開発を目的に研究を行なった。

II. 研究方法

原因遺伝子を同定するため各医療施設の倫理委員会の承認を得て患者の遺伝子を集め、マイクロサテライト法により原因遺伝子を同定する。また、内眼炎のメカニズムを解明するため炎症性サイトカインの発現、分泌について分子生物学的に検討する。新しい内眼炎の治療法として顆粒球吸着療法による炎症発作の抑制、また、抗炎症作用のあるアスタキサンチンの内眼炎に対する効果について動物実験モデルを用いて検討する。

III. 結果と考察

内眼炎の代表的疾患としてベーチェット病、原田病がある。これらの疾患では以前から遺伝的な要因がその発症に関わっているとされているが、その原因遺伝子を同定するため患者血液から遺伝子を抽出してマイクロサテライト

法を用いて原因遺伝子を同定する。H14年度は各協力施設の倫理委員会の承諾を得ることができた。炎症性サイトカインの分泌に關与するリゾリン脂質の受容体の発現細胞株を樹立できた。網膜前膜中の NF-kB の発現を糖尿病網膜症患者で検討したところ、網膜前膜の大半において NF-kB の遺伝子発現がみられた。ぶどう膜炎患者でも同様に NF-kB の発現がみられる可能性がある。ケモカインを過剰発現させたマウス (MCP-1 Tgm) では実験的に誘導する内眼炎が強くと発症することが解ったが、その動態に TNF- α をはじめとする炎症性サイトカイン産生を強力に誘導することが關与していることが推察された。

ベーチェット病の新しい治療法として、顆粒球吸着カラムを用いて内眼炎の発作を抑制する試みを行なった。患者4人に対して行なったところ2人において炎症発作回数の軽減がみられた。新しい治療法として期待される。

新しい治療薬としてカロテノイドの一種であるアスタキサンチンの抗炎症効果についてラットエンドトキシン誘発ぶどう膜炎において検討したところプレドニゾロンと同等の強い炎症抑制効果がみられた。

IV. 結論

内眼炎の発症機序について原因遺伝子を同定するための研究を開始するとともに、炎症性サイトカインの動態解明

の一役を担った。また、新たな免疫療法の開発を行なうとともに難治性の内眼炎患者に対して新しい治療を行なった。

Ⅲ. 分担研究報告

厚生科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）

分担研究報告書

難治性内眼炎の発症機序解明と新しい免疫治療に関する研究

顆粒球吸着カラムによるベーチェット病の治療に関する研究

分担研究者	大野重昭	北海道大学大学院医学研究科視覚器病学分野
	南場研一	北海道大学大学院医学研究科視覚器病学分野
	北明大州	北海道大学大学院医学研究科視覚器病学分野
	村松昌裕	北海道大学大学院医学研究科視覚器病学分野
	白取謙治	北海道大学大学院医学研究科視覚器病学分野
	大神一浩	北海道大学大学院医学研究科視覚器病学分野
	小竹 聡	北海道大学大学院医学研究科視覚器病学分野

研究要旨

ベーチェット病の眼炎症には顆粒球の局所浸潤が重要であることが知られている。そこで潰瘍性大腸炎などで有効性が確立されている顆粒球吸着カラム（アダカラム®）を用いて、ベーチェット病患者の眼炎症発作の抑制を試みた。北海道大学倫理委員会の承認を得た後に、コルヒチンあるいはシクロスポリンの内服にても眼発作を抑制できないベーチェット病患者4例に、週1回、5週間、顆粒球吸着カラムによる治療を行った。臨床効果は治療前後の発作頻度の変化で判定した。2例において発作頻度の減少がみられたが、完全な発作の抑制は得られなかった。他の2名は現在臨床経過を観察中である。アダカラムを通過した血液では白血球の分画中顆粒球の減少が見られ、接着分子の発現の変化がみられた。顆粒球吸着カラムの作用機序として顆粒球数の減少と接着分子の関与が示唆された。顆粒球吸着カラムはベーチェット病の眼炎症抑制に有効である可能性が示唆される。

A. 研究目的

ベーチェット病は青壮年期に眼炎症発作を繰り返して視力を失っていく重篤な疾患である。現在その発作抑制の

治療として、コルヒチン、シクロスポリンといった薬剤の内服が主流であるが、その効果は十分とは言えず、視力を失っていく患者が後を断たな

い。そのため新たな発作抑制の治療法の確率が急がれている。

そこで潰瘍性大腸炎などで有効性が確立されている顆粒球吸着カラム（アダカラム®）を用いて、ベーチェット病患者の眼炎症発作の抑制を試みた。

B. 研究方法

北海道大学医の倫理委員会の承認を得て研究を開始した。コルヒチンあるいはシクロスポリンの内服を行っても眼発作を抑制できないベーチェット病患者4例に、週1回、5週間、顆粒球吸着カラムによる治療を行った。静脈より血液をポンプを用いてカラムを通し、再び静脈へと返血する体外循環である。臨床効果は治療前後の発作頻度の変化で判定した。また、カラムを通過する前、および通過後の血液について、血液中の白血球分画、および細胞表面の蛋白、特に接着分子の発現についてフローサイトメトリー法を用いて検討した。

C. 研究結果

2例において発作頻度の減少がみられたが、完全な発作の抑制は得られなかった（図1、症例1、症例2）。他の2名は現在臨床経過を観察中である。

次にカラムの作用機序を解明するためにカラム前後の血液について、まず白血球分画を調べた。アダカラムを通過した血液では白血球分画中顆粒球、

単球の減少が見られた（図2）。

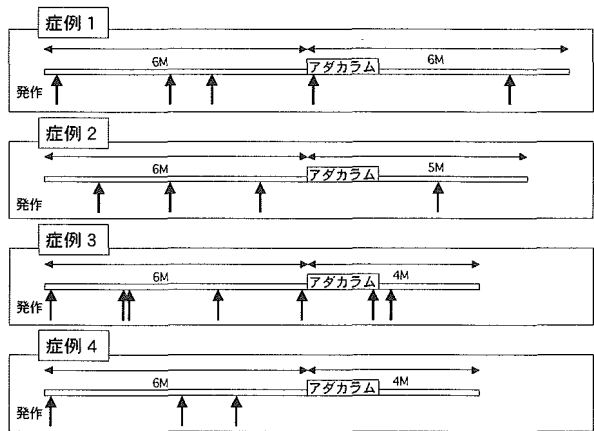


図1

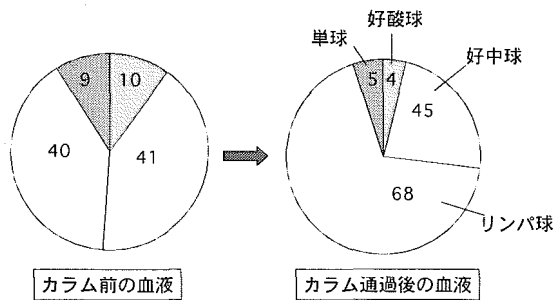


図2

フローサイトメトリー法により顆粒球細胞表面の蛋白、特に接着分子の発現について検討した。LFA-1、Mac-1の発現亢進、L-セレクチンの発現低下がみられた（図3）。

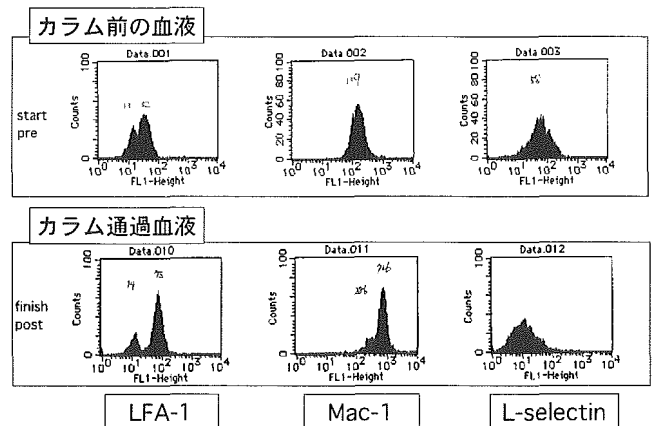


図3

D. 考察

症例数は少ないが、顆粒球吸着カラムを用いることにより眼炎症発作を抑制できることが示唆された。

その作用機序として、1、顆粒球数の減少、2、顆粒球表面の接着分子の発現パターンの変化、この2点に関与していることが示唆された。

E. 結論

ベーチェット病の新しい眼炎症発作抑制治療として顆粒球吸着カラムが有効である可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1、論文発表

1. Ohgami K, Shiratori K, Kotake S, Nishida T, Mizuki N, Yazawa K, Ohno S: The effects of astaxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo. Invest Ophthalmol Vis. Sci.,2003 (in press)
2. Mizuki N, Yabuki K, Ota M, Katsuyama Y, Ando H, Nomura E, Funakoshi K, Davatchi F, Chams H, Nikbin B, Ghaderi A A, Ohno S, Inoko H: Analysis of microsatellite polymorphism around the HLA-B locus in Iranian patients with Behcet's disease. Tissue Antigens

60:396-399,2002

3. Kitaichi N, Kotake S, Morohashi T, Onoe K, Ohno S, Taylor A W: Diminution of experimental autoimmune uveoretinitis(EAU) in mice depleted of NK cells. J Leukoc Biol 72:1117-1121,2002

4. 大野重昭：V 特定疾患別解説，難病対策ガイドブック 28 (2002)

2、学会発表

1. Ohno S : A case of iridocyclitis associated with chronic active epstein-barr virus infection . China-Japan Medical Conference2002, Beijing, 2002, 11.
2. Isogai E, Hirata M, Isogai H, Matuo K, Kimura K, Yokota K, Oguma K, Tojo M, Kaneko F, Kotake S, Ohno S : Anti-microbial activity of synthetic human CAP18 peptides to streptococcus sanguis isolated from patients with Behcet's disease . 10th International Conference on Behcet's Disease , Berlin, 2002, 6.
3. Isogai E, Hirata M, Isogai H, Matuo K, Kimura K, Yokota K, Oguma K, Tojo M, Kaneko F, Kotake S, Ohno S : Anti-microbial activity of synthetic human CAP18 peptides to streptococcus sanguis isolated from patients with Behcet's disease. 10th International Conference on Behcet's

- Disease, Berlin, 2002, 6.
4. Nishida M, Nishida T, Wakayama M, Nishida M, Ohno S : The hopes of patients with Behcet's disease from Japan to the researchers in the world. 10th International Conference on Behcet's Disease, Berlin, 2002, 6.
 5. Nishida M, Nishida T, Wakayama M, Nishida M, Ohno S : The relationship between patients and medical staffs about the social work of Behcet's disease. 10th International Conference on Behcet's Disease, Berlin, 2002, 6.
 6. Ohno S : Genes & overview. XXIXth International Congress of Ophthalmology, Sydney, 2002, 4.
 7. Kotake S, Namba K, Higashi K, Goda C, Ariga T, Ogawa A, Ohno S : The change of clinical manifestations of patients with Behcet's disease in Japan. 10th International Conference on Behcet's Disease, Berlin, 2002, 6
 8. Ohno S : Clinical feature of infection intraocular inflammation . The 28th Indonesian Ophthalmologist Association Annual Meeting, Bandung, 2002, 6.
 9. Ohno S : Immunological aspect of uveitis. The 28th Indonesian Ophthalmologist Association Annual Meeting, Bandung, 2002, 6.
 10. Ohno S : Treatment of Behcet's disease with anti-TNF- α monoclonal antibody. XXIth International Congress of Ophthalmology, Sydney, 2002, 4.
 11. 大野重昭 : ぶどう膜炎II-ベーチェット病研究の進歩-. 第106回 日本眼科学会総会, 仙台国際センター, 宮城県スポーツセンター, 2002, 5.
 12. 大野重昭 : 内眼炎の基礎と臨床. 第40回 北日本眼科学会, 弘前, 2002, 7.
 13. 大野重昭 : 教育講演6 自己免疫疾患と眼病変. 第52回 日本アレルギー学会, 横浜, 2002, 11.
 14. 大野重昭 : ベーチェット病研究の最新の進歩. 第30回 日本臨床免疫学会 総会, 東京, 2002, 12.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

厚生科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）

分担研究報告書

難治性内眼炎の発症機序解明と新しい免疫治療に関する研究

アスタキサンチンの抗炎症作用に関する研究

分担研究者 大野重昭（北海道大学大学院医学研究科視覚器病学分野 教授）

研究協力者 大神一浩¹，白取謙治¹，Iliyana Ilieva¹，小竹 聡¹，

西田朋美²，水木信久²

（北海道大学大学院医学研究科視覚器病学分野¹，横浜市大眼科学教室²）

研究要旨

カロチノイド属に含まれるアスタキサンチン(AST)はサケ，エビ，カニなどの赤色色素として天然に存在し，抗酸化作用を有することが知られている．今回，ラットエンドトキシン誘発ぶどう膜炎モデルに対する AST が及ぼす影響を検討した．その結果，前房水中のタンパク濃度は対照群と比較して，10mg/kg AST 群，100mg/kg AST 群でそれぞれ著明に低下した．次に，前房水中炎症細胞数への影響をみたところ，対照群と比較して，100mg/kg AST 群のみで有意に減少した．10mg/kg AST 群での細胞数は減少傾向がみられたが，有意差はなかった．100mg/kg AST 群の前房水中のタンパク濃度および細胞数への影響は 10mg/kg プレドニゾン群とほぼ同程度であった．今回の実験の AST 投与濃度範囲において動物に異常はみられなかった．以上のことから，ラットエンドトキシン誘発ぶどう膜炎において AST は濃度相関的に抑制作用を示し，特に 100mg/kg AST の抑制作用は 10mg/kg プレドニゾンとほぼ同程度であった．今回の結果から，AST は眼炎症に対する新しい消炎治療薬としての可能性が示唆された．

A. 研究目的

アスタキサンチン(AST)はカロチノイドの一種であるキサントフィル類に属し，サケ，イクラ，エビおよびタイなどの体表面の赤色を呈する色素に含まれている．近年，AST の生理作用として抗酸化作用¹⁾，抗ガン作用²⁾を有することが報告されている．われわれは，AST の抗酸化作用に着目し，ラットエンドト

キシン誘発ぶどう膜炎モデルを用いて，AST の抗炎症作用を検討したので報告する．

B. 研究方法

6 週齢雄性ルイスラットの両後肢足蹠皮下に LPS を 50ug(計 100ug)投与し，ラットエンドトキシン誘発ぶどう膜炎モデルを作製した．AST は 1，10 または 100mg/kg を LPS 投与

前 30 分, 投与直後, 投与 30 分後に尾静脈内に投与した. 対照群として溶媒である 60% ポリエチレングリコール投与群, 治療効果比較のため 10mg/kg プレドニゾン投与群を設けた. 1 群を 6 匹とした. LPS 投与 24 時間後に前房水を採取し, 前房水中のタンパク濃度, 前房水中炎症細胞数, PGE2, TNF-alpha および NO 濃度を測定した.

C. 研究結果

1. 前房水中のタンパク濃度への影響;

対照群と比較して, AST 投与群では濃度依存的に前房水中のタンパク濃度は低下し, 特に AST100mg/kg 群のタンパク濃度の低下はプレドニゾン 10mg/kg 投与群とほぼ同程度であった.

2. 前房水中の炎症細胞数への影響;

細胞数は前房水をチュルク染色液で染色した後, 血球計算盤を用いて細胞数を計測した. その結果, タンパク濃度と同様に, AST 投与群では濃度依存的に低下し, 特に AST 100mg/kg 群での低下の程度とプレドニゾン 10mg/kg 投与群とはほぼ同程度であった.

3. 前房水中の PGE2, TNF-alpha および IL-6 濃度への影響;

LPS で上昇した PGE2 を AST 投与は有意に抑制した. また, 前房水中のタンパク濃度および細胞数の結果と同様に AST100mg/kg での抑制の程度はプレドニゾン 10mg/kg とほぼ同等の効果を示した. 前房水中の TNF-alpha 濃度および IL-6 濃度も AST 投与により, 有意な抑制がみられた.

4. 前房水中での NO 濃度への影響;

LPS 添加なしで溶媒である 60% ポリエチレングリコールのみを投与したラット前房水中の NO 濃度は約 1 μ M であった. これに対し, AST 投与群では濃度依存的に低下し, 特に AST100mg/kg 群での低下の程度はプレドニゾン 10mg/kg 投与群とほぼ同程度であった.

D. 考察および結論

以上の結果から AST は抗炎症作用を有することが示唆された. 特に AST100mg/kg はプレドニゾン 10mg/kg とほぼ同程度の強い抗炎症作用を示した. 今後, 他の眼疾患動物病態モデルでの薬効検討を行うと同時に, 安全性の確認のため, 毒性試験などを計画しており, 臨床応用可能か検討する必要があると思われる.

E. 参考文献

- 1) Esterbauer H, Jurgens G, Quehenberger O, and Koller E. Autoxidation of human low density lipoprotein: loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes. *J Lipid Res.* 1987;28:495-509.
- 2) Tanaka T, Makita H, Ohnishi M, Mori H, Satoh K, and Hara A. Chemoprevention of rat oral carcinogenesis by naturally occurring xanthophylls, astaxanthin and canthaxanthin. *Cancer Res.* 1995;55:4059-4064.

研究発表

1. 論文発表

Ohgami K, Shiratori K, Kotake S, Nishida T, Mizuki N, Yazawa K, Ohno S; The effects of astaxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo. : *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 2003 (in

press)

2. 学会発表

- a. 大神一浩, 小竹聡, 矢澤一良, 南場研一, 水木言久, 大野重昭: ラットエンドトキシン誘発ぶどう膜炎モデルに対するアスタキサンチンの抑制効果; 第106回日本眼科学会総会, 4. 2002
- b. 大神一浩, 小竹聡, 有賀俊英, 大野重昭, 矢澤一良, 水木言久: マウスマクロファージ RAW264. 7 細胞におけるアスタキサンチンのNO産生抑制効果 ; 第36回日本眼炎症学会, 7. 2002

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）
難治性内眼炎の発症機序と新しい免疫治療に関する研究
分担研究報告書

『糖尿病性網膜症に伴う網膜前膜における NF- κ B p50 の発現』

主任研究者 大野 重昭 北海道大学大学院医学研究科
リサーチレジデント 原田 知加子 北海道大学大学院医学研究科

研究要旨 網膜前膜は 70 才以上の老人の約 20% に存在するといわれ、視力低下・複視・歪視などの原因となっている。更に今後ますます患者数の増加が予想される増殖性糖尿病網膜症においても、2 次的な網膜前膜の発症が問題となっている。そこで今回我々は網膜前膜の発症原因の 1 つとして、内眼炎でもその機能が注目される NF- κ B が関与するかどうかを検討した。

A. 研究目的

網膜前膜の発症メカニズムを解明し、新しい治療法を開発する。

B. 研究方法

他の合併症がない原発性と考えられる網膜前膜 15 検体（原発性群）と糖尿病網膜症に続発した網膜前膜 22 検体（続発性群）を入手し、NF- κ B p50 の遺伝子発現を RT-PCR 法で検討した。また蛋白レベルでの発現を免疫組織化学的に検討した。術中の検体採取の際には患者各人に事前に説明し同意を得た。

C. 研究結果

糖尿病網膜症に続発した網膜前膜の 91%（原発性群でも 60%）において NF- κ B p50 遺伝子が発現していた。また NF- κ B p50 陽性細胞の多くは、血管内皮細胞のマーカーである von Willebrand factor、あるいは血管新生因子の 1 つである interleukin-8 抗体により二重染色された。

D. 考察

網膜前膜の発症原因の 1 つとして、NF- κ B p50 の関与が考えられた。NF- κ B p50 は特に糖尿病網膜症に合併する網膜前膜内の血管新生において、重要な役割を果たす可能性が示唆された。

E. 結論

網膜前膜形成の第一歩は、網膜血管と硝子体の接触による新生血管の出現と考えられている。その意味で NF- κ B が血管新生を本態とする糖尿病網膜症に続発した網膜前膜において、高率に観察された点は興味深い。

また申請者らはすでに網膜前膜の他の主要な構成成分であるグリアに glial cell line-derived neurotrophic factor の受容体の 1 つである GFR α 2 が発現することを見い出している。グリアは成長因子を放出することで、他の構成細胞の増殖を促す危険性が指摘されている。そこで今後は網膜前膜の治療・予防において、NF- κ B, GFR α 2 などが新たなターゲットとなる可能性が考えられた。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Mitamura Y, Harada T, Harada C, Ohtsuka K, Kotake S, Ohno S, Tanaka K, Takeuchi S, Wada K : NF- κ B in epiretinal membranes after human diabetic retinopathy. *Diabetologia* : in press.

Harada T, Harada C, Mitamura Y, Akazawa C, Ohtsuka K, Ohno S, Takeuchi S, Wada K : Neurotrophic factor receptors in epiretinal membranes after human diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 25 : 1060-1065, 2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）
難治性内眼炎の発症機序解明と新しい免疫治療に関する研究

（分担）研究報告書

「ヒト MCP-1 トランスジェニックマウスにおける実験的ぶどう膜発症の増強と LPS 高感受性の関連について」

分担研究者 小野江和則（北海道大学遺伝子病制御研究所）

研究要旨 MCP-1 transgenic mouse（以下 Tgm）においては実験的ぶどう膜炎(EAU)の発症が促進あるいは増強される。高 MCP-1 血症が炎症反応にどのような影響を与えるのかをリポ多糖（LPS）に対する感受性をモデルとして解析した。Tgm においてはコントロールマウスと比較して、25mg/kg の LPS 投与での生存率が有意に低下した。また、5mg/kg の LPS 投与では、Tgm において脾臓マクロファージ亜群などの辺縁帯からの消失が強く誘導された。LPS 投与によって、Tgm では TNF- α 、IL-1、-6 などの強い産生誘導が認められた。抗 TNF- α 抗体の前投与によって、上記の生存率低下・マクロファージ亜群消失は阻止されたので、Tgm で観察された LPS 高感受性は、TNF- α 高産生に起因するものと考えられた。

分担協力者氏名

岩渕 和也

（北海道大学遺伝子病制御研究所）

南場 研一

（北海道大学大学院医学研究科）

北明 大州

（北海道大学大学院医学研究科）

佐藤 出

（北海道大学大学院医学研究科）

小竹 聡

（北海道大学大学院医学研究科）

大野 重昭

（北海道大学大学院医学研究科）

A. 研究目的

実験的自己免疫性ぶどう膜炎

（EAU）マウスモデルを MCP-1 Tgm で作製すると、発症促進あるいは症状の増強が認められる。すなわち、Tgm において、炎症反応が促進あるいは増強されている可能性が考えられる。MCP-1 が高濃度で生体内に存在することが炎症反応にどのような影響を与えるのかを検証する目的で、Tgm の LPS に対する感受性を解析した。

B. 研究方法

LPS (*E. coli* 055:B5) に対する応答性は、低容量(5 mg/kg)、高容量 (25 mg/kg)のいずれかを腹腔内投与し、生存率・体重・脾臓のマクロファージ/樹状細胞 (DC) の動態を基に判定した。脾臓の凍結切片を辺縁帯マクロファージ (MZM) は ER-TR1、金属好性マクロファージ (MMM) は抗 sialoadhesin 抗体 (MOMA-1) により免疫染色することによって区別した。DC については、抗 CD11c 抗体 (N418) にて染色し、固定した。それぞれの抗体で染色される領域は、NIH-image software で定量、比較した。

LPS 投与後にアポトーシスが生じている領域や、細胞を同定する目的で、脾臓凍結切片を *in situ* oligonucleotide ligation (ISOL) 法を用いて染色した。LPS を投与したマウスのサイトカイン産生は、RT-PCR あるいは ELISA を用いて検討した。動物実験に関しては北海道大学動物実験委員会に実験計画書を提出し、承認を受けた後、方法を遵守して行った。

C. 研究結果

Tgm では non-Tgm より高容量 LPS 投与に対する生存率の低下 (20% vs 80%) が著しく、低容量の LPS 投与によって生じる体重減少からの回復

も有意に遅延し、LPS に対する感受性が亢進していた。さらに Tgm では MZM の消失や、DC の移動・消失が低容量の LPS 投与によって誘導された。これらの現象は、non-Tgm では認められないか、あるいは軽度の移動・消失が LPS 投与後期に認められるのみであった。これら Tgm における LPS 感受性亢進のメカニズムを検討する目的で、高容量 LPS 投与 24 時間後脾臓の凍結切片を作製し、DNA の double strand break (DSB) を ISOL 法を用いて検出した。その結果、Tgm において有意に多くの DSB が辺縁帯・濾胞内で検出された。従って、MZM/MMM/DC は、表面抗原を down-modulation したために免疫組織学的に捉えられないのではなく、アポトーシスで実際に消失していると考えられた。脾臓マクロファージの消失は、LPS 投与 Tgm に indian ink を *i.v.*しても、辺縁帯に取り込まれる像が認められないことから、機能的にも証明された。

MCP-1 Tgm において LPS 投与後のアポトーシスが、何故亢進しているのかを明らかにするために、サイトカイン産生を解析した。その結果、non-Tgm と比較して大量の TNF- α 、IL-1 α 、-6、-10 が Tgm で産生されていることが判明した。LPS 投与の 30 分前に、抗 TNF- α 中和抗体 (300 μ g)

を Tgm に i.v.しておくこと、MZM の消滅が阻止出来ることから、LPS 投与後の脾臓マクロファージ垂群の消滅は、低容量の LPS でも強く産生誘導される TNF- α と関連していると考えられた。

D. 考察

マウスエンドトキシンショックモデルで、LPS 投与後早期、かつ一過性に MCP-1 の産生が生じること。この MCP-1 は、エンドトキシンショックにおいて防御的に働くことが示されている (Zisman et al. *J. Clin. Invest.* 99: 2832-6, 1997.)。恒常的に高 MCP-1 血症を呈している Tgm においては、内因性 (マウス) MCP-1 の一過性上昇が機能し得ないことが、TNF- α の過剰産生に関わっていると考えられた。MCP-1 Tgm において認められる内眼炎発症促進、あるいは増強に同様の炎症病態が関与するのではないかと考えられる。ベーチェット病と TNF- α の関わりについては、ヒト型抗 TNF- α 抗体を使用することによりぶどう膜炎の発作回数を減少出来ることが報告されている。ヒト MCP-1 Tgm で、LPS 投与後、TNF- α が上昇するメカニズムを明らかにすることは、内眼炎発作やそれに伴う視機能低下を防止する方策を開発する上で重要と考えられた。

E. 結論

MCP-1 Tgm は TNF- α をはじめとする pro-inflammatory cytokine 産生の強力な誘導を介して LPS 高感受性を呈する。

F. 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yanagawa, Y., Iijima, N., Iwabuchi, K. and Onoé K.: Activation of extracellular signal-related kinase by TNF- α controls the maturation and function of murine dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 71, 125-132, 2002
- 2) Ato, M., Iwabuchi, K., Shimada, S., Mukaida, N., and Onoé K.: Augmented expression of TNF- α introduced by lipopolysaccharide (LPS) in spleen of human monocyte chemoattractant protein-1 transgenic mouse enhances sensitivity of the marginal zone macrophages to the LPS. *Immunology* 106: 1-15, 2002
- 3) Kikuchi, S., Shinpo, K., Niino, M., Tsuji, S., Iwabuchi, K., Onoé K., and Tashiro, K.: Prostaglandin E (1) protects cultured spinal neurons against the effects of nitric oxide toxicity. *Neuropharmacology*, 42, 714-723, 2002
- 4) Kizaki, T., Suzuki, K., Hitomi, Y.,