

disease 第 11 回 Lancefield レンサ球菌研究会 プログラム・抄録 17、2002

2002 年 6 月 1 日～2 日 徳島

5) 林 松男、阪口義彦、関 鋭、藤浪良仁、横田憲治、磯貝 浩、磯貝恵美子、長町栄子、小熊恵二 種々の口腔レンサ球菌の熱ショック蛋白質 60 遺伝子の塩基配列の決定とその解析 第 55 回日本細菌学会中国・四国支部総会 プログラム予稿抄録 32、2002  
2002 年 10 月 17 日～18 日 岡山

表1 BD 113 - 20 HSP60 とのアミノ酸相同性

菌	相同性(%)
BD 114-23	98
BD 118 - 1	92
MCLS - 1	97
MCLS - 2	99
<i>S. sanguis</i> ATCC10556	99
<i>S. oralis</i> ATCC10557	92
<i>S. gordonii</i> ATCC 10558	98

表2 BD 113 - 20 HSP60 とのアミノ酸相同性

菌	相同性(%)
BD 114 - 23*	98
<i>S. pneumoniae</i>	97 ~ 98
<i>S. gordonii</i>	93
<i>S. salivarius</i> *	87
<i>S. pyogenes</i>	87
<i>S. agalactiae</i>	87
<i>E. faecalis</i>	82
<i>S. aureus</i>	69 ~ 72
<i>S. epidermidis</i>	69
<i>E. coli</i>	54 ~ 62
<i>H. pylori</i>	61
<i>M. bovis</i>	60
<i>Homo sapiens</i>	45 ~ 51

表 3 *S. sanguis* 113-20 株由来ペプチド

	名称	位置	数	配列	分子量
1	LO1	249-264	16	<u>ADDVDGEALPTLVLNK</u>	1668
2	UK	311-326	16	<u>TIEALGQAARVTVDKD</u>	1685
3	IIIa	365-384	20	<u>ERLAKLSGGVAVIKVGAATE</u>	1967
4	IIIb	395-413	19	<u>EDALNATRAAVEEGIVAGG</u>	1841
5	LO2	480-499	20	<u>GEWVNMIEEGIIDPVKVSRS</u>	2256
6	LO3	504-518	15	<u>AASVASLILTTEAVV</u>	1443

下線で示したアミノ酸残基はヒトの HSP60 と同じ領域です。

図1 BD 113 - 20 HSP 60 と共通なタンパク質の1次構造

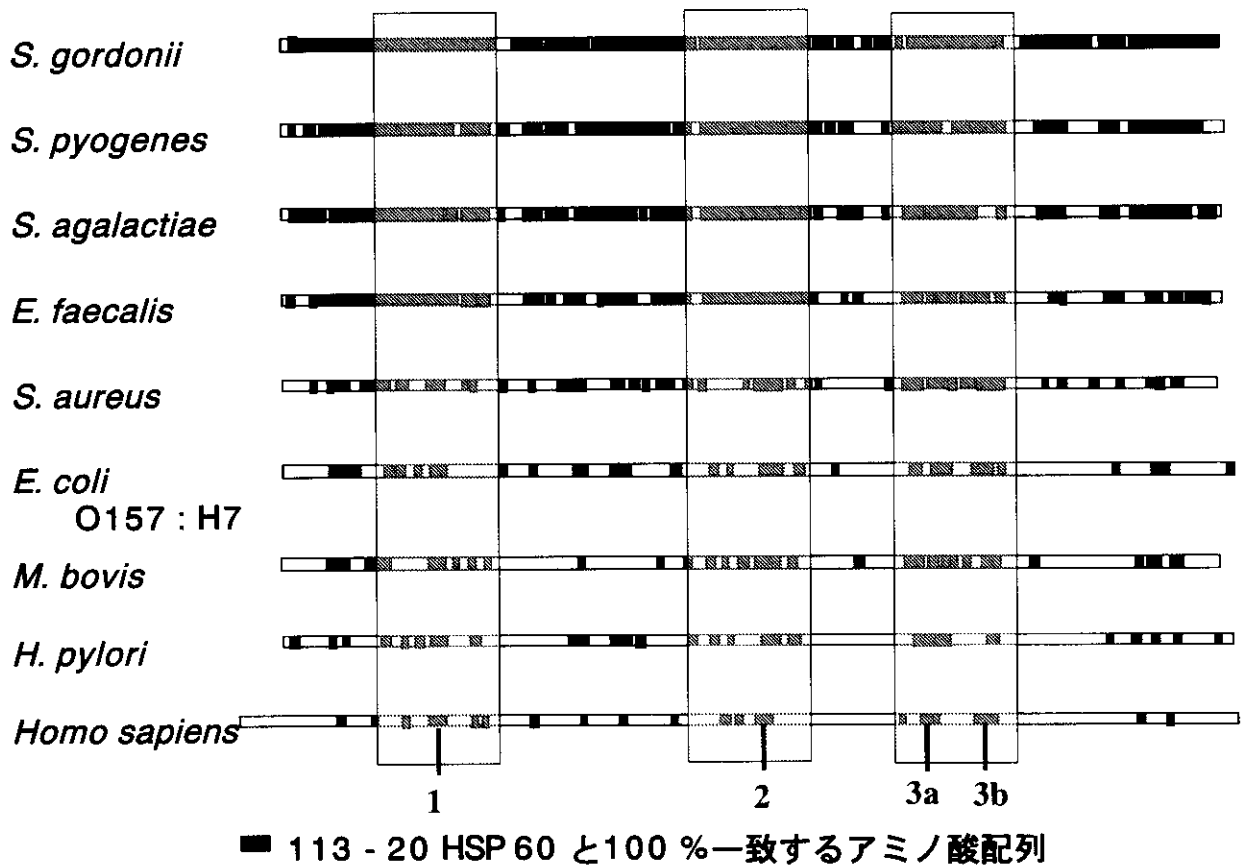
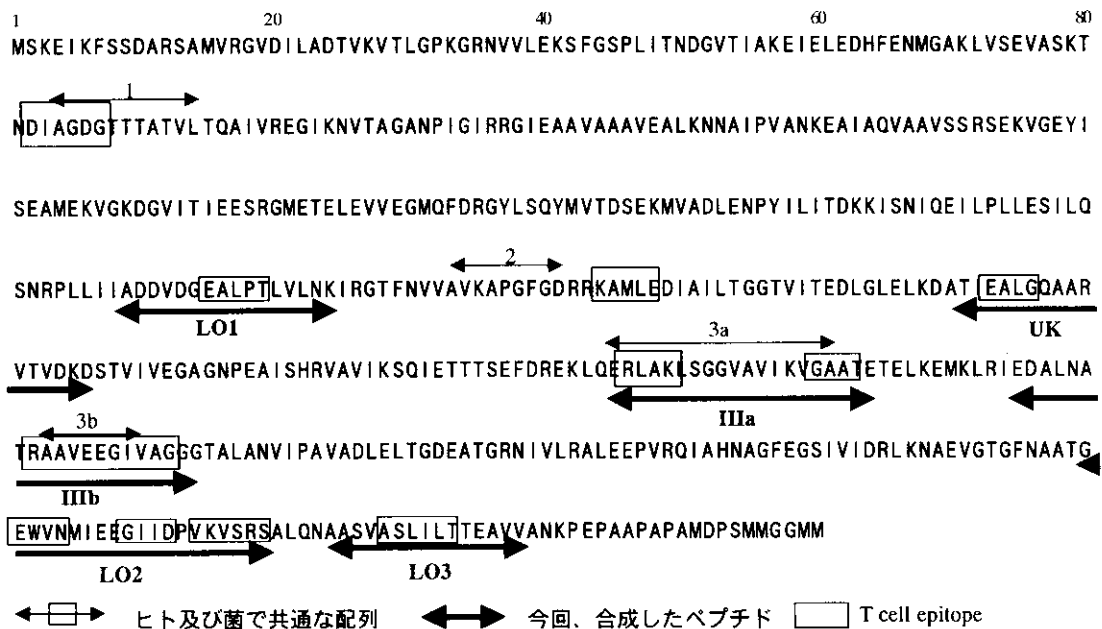


図2 Newly prepared six peptides of BD 113-20 HSP60



厚生労働科学研究費補助金 ( 特定疾患対策研究事業 )

分担研究報告書

ベーチェット病モデル動物を用いたぶどう膜炎発症・進展に対する  
ケモカインの関与について

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 はぶどう膜炎病変部に発現し、T 細胞や単球・マクロファージなどの遊走・侵潤などに関与していると推定される。MCP-1 トランスジェニックマウスでは、ぶどう膜炎の発症促進、あるいは病理組織スコアの増悪が認められた。したがって、MCP-1 の機能を抗 MCP-1 抗体で中和すれば、マウスぶどう膜炎の病態は改善するものと予想された。しかし、抗原感作時から抗 MCP-1 中和抗体を投与した群では、コントロール抗体投与群よりもぶどう膜炎の病理組織スコアが高いことが判明した。抗 MCP-1 中和抗体投与群では、T 細胞の抗原特異的増殖反応が増強していた。また培養上清中のサイトカイン産生を解析したところ、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-5 が有意に高く、これらがぶどう膜炎の増悪に関与していると考えられた。

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

MCP-1 は CC ケモカインに属し、単球やメモリーT細胞の走化性亢進をもたらす。我々は、ヒト $\beta$  アクチンプロモーターでヒト MCP-1 の発現を駆動するトランスジェニックマウス

( Tgm ) を作製した。MCP-1 Tgm は、血中に高濃度のヒト MCP-1 蛋白を発現し、接触性過敏反応が増強することなどがこれまでの解析から判明している。今回、ぶどう膜炎の抑制にケモカイン、特に MCP-1 を標的とすることが可能かを研究する目的で、MCP-1 Tgm を用いた実験的自己免疫性ぶど

う膜炎 (EAU) モデルを解析した。また C57BL/6 (B6) マウスを用い、抗 MCP-1 抗体によるぶどう膜炎の発症抑制を試みた。

## B. 研究方法

EAU は Tgm、non-Tgm (B6 の背景) あるいは B6 の頸部背側、腰部背側に human interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) peptide 1-20 + 完全フロイントアジュバント 100 $\mu$ l を投与し、同日百日咳毒素 0.1  $\mu$ g/マウスを腹腔内投与することによって誘導した。翌日より、マウスを散瞳後眼底を Bonnoscope と Super Field NC Lens (Volk Optical) にて観察し、Thurau らの基準に従ってスコア化 (0~4) した。

また、眼球についてはグルタールアルデヒド前固定/ホルマリン後固定の後、パラフィン切片を Hematoxylin/eosin 染色し、病理組織学的評価 (0~4) を行った。抗 MCP-1 抗体 (Pharmingen 社; クローン 2H5)、およびコントロールハムスター IgG (Jackson ImmunoResearch 社) の投与は、5 $\mu$ g/マウス/日で、前述の如く感作した C57BL/6 マウスに、感作当日から連日 (3週間) 行った。

抗原特異的増殖反応は、<sup>3</sup>H-thymidine (ICN; 1.85 kBq/ウェル) を培養最終 16 時間パルスラベルし、

その取り込みを解析することにより行った。また、培養上清中に放出されたサイトカインは、CBA (Cytometric Beads Array; Pharmingen) を用い、フローサイトメトリーで産生量を評価した。動物実験については、実験計画書を北海道大学動物実験委員会に提出し、承認を受け、その方法を遵守して行った。

## C. 研究結果

感作後 19 日目の段階では、ぶどう膜炎発症眼が non-Tgm では 1/10 (10%) であるのに対し、Tgm では 9/20 (45%) と、Tgm で高い割合を示した。しかし、感作後 23 日目では、Tgm では 85%、non-Tgm でも 70%、clinical score では、Tgm、1.8、non-Tgm、1.3 で著差は認められなかった。EAU のピーク時の比較においても、Tgm、non-Tgm とともにスコア 2 前後となり、またその後の症状の消退においても、両者で差は認められなかった。同様の実験を再度行ったが、15、17 日でのスコアは Tgm において高いが、EAU ピーク時の重症度は同等であった。これらの結果から、Tgm では発症が促進されると考えられた。しかし、異なる MCP-1 Tgm と non-Tgm を用い、EAU を比較したところ、ピーク前期、ピーク時いずれにおいても重症度が Tgm で高いことが示

された。この場合には発症促進のみならず、重症度も上昇することを示していると考えられた。現在、実験を反復し、血中 MCP-1 値と EAU 重症度の関係を明確化し、MCP-1 が発症促進・重症化のいずれにより強く影響するか、検証中である。

次に、MCP-1 高値が発症促進・重症化と密接に関連するならば、MCP-1 作用の阻止が、ぶどう膜炎発症抑制の治療戦略となり得るかを検証するために、正常 B6 マウスを用いた実験を行った。即ち、B6 マウスに EAU を誘導し、抗マウス MCP-1 中和抗体投与によって発症抑制が可能であるかを検討した。その結果、予期に反して、中和抗体投与群でより平均病理組織スコアが高い(悪化する)ことが判明した。そのメカニズムを明らかにするために、抗原(IRBP p1-20)に対する T 細胞増殖反応を解析すると、コントロール Ig 投与群と比べ、抗 MCP-1 抗体投与群の T 細胞では、より低い抗原濃度で高い Thymidine 取り込みが認められた。また、同反応時の培養上清中のサイトカインを解析すると、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-5 の産生が抗 MCP-1 抗体投与群で極めて高値を示していた。IL-2、-4 の産生はコントロール Ig 投与群と同様低値であった。上記 2 種の T 細胞応答の結果は、中和抗体投与群で

病変が高度であったことに適合していると考えられた。

#### D. 考察

MCP-1 Tgm でぶどう膜炎の発症促進や臨床スコアの上昇が認められた。同 Tgm で接触性過敏反応が亢進しており、これは皮膚ランゲルハンス細胞の活性亢進によることを我々は報告している。従って、特に免疫応答が強く生じる可能性として、樹状細胞のリクルートメントや刺激活性について検討する必要があると考えられた。

CLP (cecal ligation and puncture) という腹膜炎のモデルにおいて、抗 MCP-1 抗体投与を行うと IL-13 $\downarrow$ 、TNF- $\alpha$   $\uparrow$ 、IL-12 $\downarrow$ 、IL-10 $\uparrow$  などの動きが認められることから、MCP-1 は anti-inflammatory、immune-enhancing chemokine (Exp. Mol. Pathol. 68: 77, 2000) であると考えられている。中和抗体投与群で、ぶどう膜炎が増強する点については、この anti-inflammatory な側面をブロックすることが一次的原因であると考えているが、どのようなメカニズムでそのような現象が生じるかは未だに不明である。今後更に追究すべき点である。また、CCR2 に対する介入がどのような効果を有するかについても、あらたな検討が必要と考えられる。

## E. 結論

本研究より以下の2点が結論された。

1. MCP-1 はぶどう膜炎の発症・進展過程に参与している。
2. ぶどう膜炎に抗 MCP-1 抗体を使用することは、病態をかえって重症化させる可能性がある。

## 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- $\alpha$  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- $\alpha$  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., Onoé, K., Day, N. K., Good, R. A., Taniguchi, N., and Ohno, H.: Uncoupling protein 2 plays an important role in nitric oxide production of lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 9392-9397, 2002
- 5) Onoé, K., Iwabuchi, K., Iwabuchi, C., Tone, S., Konishi, J., Kawakami, Y., Nishimura, M., and Onoé, K.: Enhanced complement sensitivity of NK-T cells in murine thymus and spleen associated with presence of serum immunoglobulin. *Immuno-biology* 206:377-391, 2002
- 6) Onodera, S., Nishihara, K., Iwabuchi, K., Tanaka, S., and Minami, A.: Signaling pathways on the up-regulation of matrix metallo-proteinase-13 in rat osteoblasts in response to macrophage migration inhibitory factor. *J. Biol. Chem.*, 277, 7865-7874, 2002
- 7) Izutsu, Y., Tochinnai, S., Maeno, M., Iwabuchi, K., and Onoé, K.: Larval antigen molecules recognized by adult immune cells of inbred *Xenopus laevis*; Partial characterization and implication in metamorphosis. *Dev. Growth Differ.* 44: 477-488, 2002
- 8) Aranami, T., Iwabuchi, K., and Onoé, K.: Syngeneic mixed lymphocyte reaction (SMLR) with dendritic cells: Direct visualization of dividing T cell subsets in SMLR. *Cell. Immunol.* 217: 67-77, 2002
- 9) Kikuchi, K., Yanagawa, Y., Aranami, T., Iwabuchi, C., Iwabuchi, K., and Onoé K.: TNF- $\alpha$  but not LPS enhances preference of murine dendritic cells for Th2 differentiation. *Immunology* 107: 1-7, 2003
- 10) Kitaichi, N., Koake, S., Morohashi, T., Onoé, K., Ohno, S., and Taylor, A.W.: Diminution of experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) in mice depleted of NK cells. *J. Leukoc. Biol.*, 72:1117-21, 2002
- 11) Yamada, H., Morikawa, M., Furuta, I.,



- Kato-Hirayama, E., Shimada, S., Iwabuchi, K., and Minakami, M.: Intravenous immunoglobulin treatment in women with recurrent abortions: Increased cytokine levels and reduced Th1/Th2 lymphocyte ratio in peripheral blood. *Am. J. Reprod. Immunol.* (in press)
- 12) Onoé, K., Gotohda, T., Nishihori, H., Aranami, T., Iwabuchi, C., Iclozan, C., Morohashi, T., Ogasawara, K., Good R. A., and Iwabuchi, K.: Positive and negative selection of T cell repertoires during differentiation in allogeneic bone marrow chimeras. *Transplant. Immunol.* (in press)
- 13) Shimada, S., Iwabuchi, K., Kato-Hirayama, E., Morikawa, M., Sakuragi, N., Onoé, K., Minakami, H., and Yamada, H.: No difference in natural-killer-T cell population, but Th2/Tc2 predominance in peripheral blood of recurrent aborters. *Am. J. Reprod. Immunol.* (in press)
- 14) Onoé, K., Kitaichi, N., Ohno, S., Iwabuchi, C., and Iwabuchi, K.: 「NK and NK-T cells possibly involved in behçet's disease」, "Immunology of Behçet's Disease." Swets & Zeitlinger. Lisse, The Netherlands (in press)
- 15) Zierhut, M., Mizuki, N., Ohno, S., Inoko, H., Gül, A., Onoé, K., and Isogai, M.: Immunology and functional genomics of Behçet's disease. *Cell. Mol. Life Sci.* (in press)
- 16) Shimada, S., Iwabuchi, K., Watano, K., Shimizu, H., Yamada, H., Minakami, H., and Onoé, K.: Expression of allograft inflammatory factor-1 in mouse uterus and poly (I: C)-induced fetal resorption. *Am. J. Reprod. Immunol.* (in press)
- 17) Yanagawa, Y., and Onoé, K.: CCR7 ligands induce rapid endocytosis in mature dendritic cells with concomitant upregulation of Cdc42 and Rac activities. *Blood* (in press)
2. 学会発表
- 1) 小野江和則, 岩淵和也: 同系樹状細胞に反応して増殖する T 細胞亜群の解析. 第 91 回日本病理学会総会, 2002.(於 東京)
- 2) 岩淵和也, 小野江和則: 単球走化蛋白 (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炎モデルの解析. 第 91 回日本病理学会総会, 2002.(於 東京)
- 3) 柳川芳毅, 岩淵和也, 鈴木 元, 中田有紀子, 小野江和則: ケモカインによる胸腺 T 細胞遊走に対する細胞外マトリクスの影響. 第 21 回日本胸腺研究会, 2002.(於 長崎)
- 4) 中井之人, 石森直樹, 綿野敬子, 三島鉄也, 藤井 聡, 北畠 顕, 岩淵和也, 小野江和則: 骨髓細胞を用いた動脈硬化病巣進展の抑制. フォーラム高血圧と臓器障害, 2002(於 東京)
- 5) 新野正明, 岩淵和也, 菊地誠志, 阿戸 学, 諸橋大樹, 緒方昭彦, 小野江和則, 田代邦雄: ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体  $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) 特異的リガンド、troglitazone による実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) 抑制. 第 14 回日本神経免疫学会, 2002.(於

- 東京)
- 6) Kikuchi, K., Yanagawa, Y., Iwabuchi, K., and Onoé, K.: Workshop. TNF- $\alpha$  but not LPS enhances preference of murine DC for Th2 differentiation. The 3rd International Workshop of KTCC Meeting, 2002. (at Kyoto)
- 7) 三島鉄也、綿野敬子、中井之人、藤井 聡、北島 顕、岩淵和也、小野江和則：マウス異所性気管植え込みモデルにおけるアログラフィト炎症因子の関与とその作用。第 6 回北海道移植フォーラム。(於 札幌)
- 8) 飯島則文、柳川芳毅、岩淵和也、小野江和則：Extracell signal-related kinase の活性化はマウス樹状細胞の分化および機能を負に調節する。第 29 回北海道免疫研究会、2002。於 札幌)
- 9) 柳川芳毅、飯島則文、岩淵和也、小野江和則：ワークショップ Extracellular signal-related kinase の活性化はマウス樹状細胞の分化および機能を負に調節する。第 42 回日本リンパ網内系学会。2002。(於 岡山)
- 10) 岩淵和也：特別講演 NKT 細胞分化と生体機能。-T 細胞分化との共通点と相違点。第 35 回北海道病理談話会。2000。(於 旭川)
- 11) 菊地一博，柳川芳毅，荒浪利昌，岩淵千雅子，岩淵和也，小野江和則：樹状細胞の Th1/2 化誘導に対する TNF- $\alpha$  および LPS の影響。
- 12) 中井之人，岩淵和也，藤井 聡，石森直樹，三島鉄也，中山俊憲，谷口 克，Luc Van Kaer，小野江和則：マウス動脈硬化モデルにおいて NKT 細胞は動脈硬化促進性に寄与する。第 35 回北海道病理談話会。2002。(於 旭川)
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

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

ベーチェット病における白血球、樹状細胞の研究

分担研究者 中村晃一郎（福島県立医科大学皮膚科・助教授）

**研究要旨** ベーチェット病では皮疹部に好中球浸潤を主体とする結節性紅斑などの皮膚症状を認め、病巣局所あるいは末梢血中の白血球機能亢進を認める。これまで本疾患の病態として末梢血 CXCR3 陽性 T 細胞増加など Th1 優位であることを明らかにしている。本年度は、Th1 への分化を誘導する細胞として皮膚における樹状細胞であるランゲルハンス細胞 (LC) を採取し、その性状について検討した。本細胞パーベック顆粒を有し、CD80、CD86 などの接着分子を発現し、CD11a、CD11b 陽性であった。CD14 陰性であった。LC の IL-12 産生に対するサイトカイン (GM-CSF) の影響について検討したところ、IL-12 産生能に変化を生じることが認められた。ベーチェット病の病態で LC のサイトカイン産生能の変化によって炎症部位への T 細胞浸潤パターンが変化する可能性が示唆された。

分担研究者：中村晃一郎（福島県立医科大学皮膚科学）

共同研究者：金子史男、古川裕利（福島県立医科大学皮膚科学）、朝比奈昭彦、多田弥生、玉置邦彦（東京大学大学院医学系研究科皮膚科学）

A. 研究目的：ベーチェット病では皮疹部に好中球浸潤を主体とする結節性紅斑、潰瘍形成などの皮膚症状を認め、病巣局所あるいは末梢血中の白血球機能亢進を認める。本疾患をサイトカイン (Th1、Th2 サイトカイン) の異常から見た場合、IL-12 産生亢進など Th1 優位の状態と捉えることができる。Th1 への分化を誘導する細胞として皮膚における樹状細胞であるランゲルハンス細胞 (LC) があげられる。本細胞は CD80、CD86 などの接着分子を発現する抗原提示細胞であり表皮に在住する

細胞である。マウス表皮から LC を 95%以上の純度で採取し、この細胞の表面抗原発現について解析した。また LC の IL-12 産生に対するサイトカイン (GM-CSF) の作用について検討した。

B. 研究方法：マウス表皮から純度 95%以上の LC を精製し、その細胞表面抗原の発現について検討した。さらに抗 CD40 抗体、IFN- $\gamma$ で刺激した条件で IL-12 産生を検討し、さらに GM-CSF を加えた系で IL-12 産生能を検討した。

C. 研究結果：精製 LC は電顕的にパーベック顆粒を有する細胞であり、CD11a 陽性 CD11b 陽性、CD80、CD86 陽性細胞であった。抗 CD40 抗体、IFN- $\gamma$ 刺激下において精製 LC の I は著明に増加し、GM-CSF は濃度依存性にこの産生を抑制した。

D. 考察：表皮から表皮細胞を単離し純度 95% 以上で LC を採取した。この細胞はバーベック顆粒を有しており、接着分子である CD80, CD86 を発現し、抗原提示細胞であることが明らかにされた。またサイトカインによる LC の IL-12 産生能を検討したところ、GM-CSF などのサイトカインによって IL-12 産生能が抑制された。

このことから、LC の Th1 誘導の能は外界のサイトカインの影響を受けることが明らかにされ、LC にいわゆる DC1, DC2 の機能を有する可能性が考えられた。LC には TLR (toll like receptor) が存在し、innate immunity に関与することが示されているため、外来抗原、LPS や HSP (heat shock protein) などを介して、LC の Th1 誘導能、IL-12 産生能がどのような変化を生じるのかを検討することが今後の課題であると考えられる。

E. 結論 ベーチェット病の病態を T 細胞機能を Th1/Th2 バランスから論じた場合、末梢血メモリー T 細胞中に CXCR3 陽性細胞増加などに見られるように Th1 サイトカインが有意な状態と考えられる。Th1/Th2 バランスの形成には皮膚の抗原提示細胞である LC が大きな役割を担っており、皮膚局所のサイトカイン産生によって影響を受けることが明らかになった。このように表皮から LC を高純度で採取し、Th1 へのシフトに関する影響を検討することが今後有用であると考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Tojo M, Zheng X, Yanagihori H, Oyama N, Takahashi K, Nakamura K, Kaneko F. Detection of herpes virus genomes in skin lesions from

patients with Bechet disease and other related inflammatory diseases. *Acta Derm Venero* 2003; 183: 1-4.

2) X Zheng, Nakamura K, Tojo M, Oyama N, Nichibu A, Satoh M, Kakinuma T, Wakugawa M, Tamaki K, Kaneko F. TGF- $\beta$ 1-mediated regulation of thymus and activation regulated chemokine synthesis and secretion by HaCaT cells co-stimulated with TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ . *J Dermatol Sci*. 2002; 30(2):154-60.

3) Nagaoka Y, Nakamura K, Yasaka N, Watanabe T, Asahina A, Tamaki K. Identification and Characterization of the Low-Affinity Receptor for Immunoglobulin E (FcepsilonRII/CD23) on Murine Langerhans Cells. *J Invest Dermatol*. 2002. 119(1), 130-6.

4) Tsunemi Y, Saeki H, Nakamura K, Sekiya T, Hirai K, Fujita H, Asano N, Tanida Y, Kakinuma T, Wakugawa M, Torii H, Tamaki K. Eotaxin gene single nucleotide polymorphisms in the promoter and exon regions are not associated with susceptibility to atopic dermatitis, but two of them in the promoter region are associated with IgE levels in patients with atopic dermatitis. *J Dermatol Sci*. 29, 222-228, 2002.

5) Kobayashi N, Taguchi-Nakamura H, Goto M, Nakamura T, Nakamura K, Sugiura W, Iwamoto A, Kitamura Y. Polymorphisms and haplotypes of the CD209L gene and their association with the clinical course of HIV- positive Japanese patients. *Jpn J Infect Dis* 55: 131-133, 2002.

6) Kakinuma T, Nakamura K, Wakugawa M, Mitsui H, Tada Y, Saeki H, Torii H, Komine M, Asahina A, Tamaki K. Serum macrophage - derived chemokine (MDC) levels are closely related with the disease activity of atopic

dermatitis. Clin Exp Immunol. 2002; 127(2):270-3.

7) Kakinuma T, Nakamura K, Wakugawa M, Yano S, Saeki H, Torii H, Komine M, Asahina A, Tamaki K. IL-4, but not IL-13, modulate TARC (thymus and activation-regulated chemokine) / CCL17 and IP-10 (Interferon- $\gamma$ -induced protein of 10kDa) / CXCL10 released by TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  in HaCaT cell line. Cytokine. 2002; 20(1):1-6.

8) Tsunemi Y, Saeki H, Nakamura K, Sekiya T, Hirai K, Fujita H, Asano N, Kishimoto M, Tanida Y, Kakinuma T, Mitsui H, Tada Y, Wakugawa M, Torii H, Komine M, Asahina A, Tamaki K. Interleukin-12 p40 gene (IL12B) 3'-untranslated region polymorphism is associated with susceptibility to atopic dermatitis and psoriasis vulgaris. J Dermatol Sci. 2002; 30(2):161-6.

9) Tsunemi Y, Saeki H, Nakamura K, Sekiya T, Hirai K, Kakinuma T, Fujita H, Asano N, Tanida Y, Wakugawa M, Torii H, Tamaki K. Interleukin-13 gene polymorphism G4257A is associated with atopic dermatitis in Japanese patients. J Dermatol Sci. 2002 ;30(2):100-7.

10) Kakinuma T, Sugaya M, Nakamura K, Kaneko F, Wakugawa M, Matsushima K, Tamaki K. Thymus and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) in mycosis fungoides: Serum TARC levels reflect the disease activity of mycosis fungoides. J Am Acad Dermatol. 2003 ; 48(1):23-30.

## 2. 学会発表

1) K Nakamura. Topic experience of topical macrolide in Japan. The 5<sup>th</sup> Asia Pacific Congress of Allergology and Clinical Immunology. The 7<sup>th</sup> West Pacific Allergy Symposium. (APACI-WPAS 2002). October 13, 2002. Seoul. Korea.

2) K Nakamura. TGF- $\beta$ 1 inhibits TARC production by HaCaT cells. World Congress of Dermatology. Paris. July 4<sup>th</sup> 2002.

H. 知的財産権の出願、登録状況

1 特許申請 なし

2 実用新案登録 なし

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

Behcet 病における IL-12p40 および IL-12receptor  $\beta 2$  の遺伝子学的検討

主任研究者 金子史男 福島県立医科大学医学部皮膚科学教室教授

共同研究者 柳堀浩克 福島県立医科大学 皮膚科学講座

井上智子 福島県立医科大学 皮膚科学講座

東條理子 福島県立医科大学 皮膚科学講座

中村晃一郎 福島県立医科大学 皮膚科学講座

研究要旨 Behcet 病 (BD) における慢性炎症に Th1 型サイトカインが重要な役割を果たしている。今回我々はその産生調節に関与する、IL12 p 40 の SNP 解析と IL12 レセプター  $\beta 2$  (IL-12R  $\beta 2$ ) の変異について検討した。IL12 p 40 の untranslated region の single nucleotide polymorphism (SNP) 解析は BD 患者 17 例、健常人 59 例を対象とし末梢血有核細胞より抽出した genomic DNA と、重複する BD 患者 10 例、健常人 33 例の末梢血単核球より合成した cDNA を使用した。まず、IL-12p40 の SNP について、genomic DNA を用いて制限酵素 Taq I による RFLP を行ったが、民族間での有意差の報告はあるものの BD と正常人群では有意差を認めなかった。次にこれまで、アトピー性皮膚炎 (AD) で報告のある、IL12R  $\beta 2$  の変異、欠失 (1577A to G 、 2799A to G 、 2496 del 91) について BD、健常人群での解析を行った。1577A to G は genomic DNA を用いた direct sequence により解析し、また 2799A to G は制限酵素 Mae II を用いて RFLP を行った。また 2799A to G は editing により生じる事が報告されており、cDNA を用いて同様の RFLP を行ったが、やはり変異は認めなかった。さらに cDNA を用いた 2496 del 91 の検索では全ての症例で欠失のバンドは認められなかった。IL-12R  $\beta 2$  のいずれの部位にも変異、欠失を認めず、BD が AD とは異なる Th1 型の疾患であるという事を裏付ける結果となった。

A. 背景: BD と IL-12 に関して、活動期の BD では Th1 型サイトカインである IFN $\gamma$ 、IL12 の産生量が増加している報告や、病勢に応じて Th1 と Th2 のバランスが変化すると報告されている。BD の病態には種々の細胞性免疫機序が関与すると考えられており、特に Th1 型サイトカインの産生調節を行う IL12 が病態に深く関与していると

思われる。(図 1)

B. 研究目的: Th1 優位型の疾患で重要な役割を果たしている IL12 と IL-12R について BD 患者における遺伝子学的検討を行う事を目的としてこれまでの報告をもとに IL-12 p40 の SNP 解析<sup>1</sup> (図 2)、IL12R  $\beta 2$  の変異と欠失の (図 3) 検索<sup>2</sup>を行った。

C. 方法：BD 患者 17 名、正常人 59 名より genomic DNA を抽出し PCR で増幅した後、IL12-p40 では制限酵素 TaqI を用いて restriction fragment length polymorphism (RFLP) を行った。IL-12R  $\beta$  2 の 1577AtoG の検索は PCR で増幅した後、CEQ2000 (BECKMAN COULTER) を用いて direct sequence を行った。2799AtoG の検索は PCR で増幅した後、制限酵素 Mae II を用いて RFLP を行った。2496del91 の検索は BD 患者 10 名、健常人 33 名の末梢血単核球より RNA を抽出し、合成した cDNA を用いた RT-PCR により欠失の有無を確認した (図 4)。

D. 結果：IL12p40 の allele は BD 患者で alleleA:15, alleleC19, 正常人コントロールでは alleleA:59, alleleC59, であった。Fisher's exact test で統計処理したところ、BD 群と正常人群で有意差はみられなかった (図 5)。IL-12R  $\beta$  2 の変異検索では 1577AtoG、2799AtoG、2496del91 のいずれにおいても、変異、欠失を認めなかった (図 6)。

E. 考按：今回は IL-12 p40 の SNP 検索において有意差を認めなかったが、BD 群の検体数が 17 と少ないため、今後は検体数を増やし解析をする必要があると思われる。IL-12R  $\beta$  2 においては変異、欠失を認めないことより、BD が AD とは異なる Th1 型の疾患であるとい

う事を裏付ける結果となった。

F. 研究発表：ベーチェット病に関する調査研究 平成 14 年度第 2 回研究会 (H15.1.17 福島)

G. 文献：

- 1) MA Hall, E mcGlenn, et al. Genetic polymorphism of IL-12 p40 gene in immunemediated disease. Gene Immun 2000;1:219-24
- 2) Matsui et al. Mutation of the IL-12 receptor  $\beta$  2 chain gene in atopic subjects 1999;266:551-55

図の説明

図 1. これまでに報告のあった BD と IL12 に関する報告

図 2. IL-12 p40 の UTR における SNP 部位と制限酵素 TaqI のサイト

図 3. IL-12R  $\beta$  2 の変異、欠失部位とアトピー性皮膚炎患者における報告

図 4. 方法

用いた PCR プライマー。IL-12p40 は制限酵素 TaqI での RFLP を行った。2799AtoG は Mae II による PCR-RFLP を、1577AtoG は direct sequence を、また 2496del91 は nested RT-PCR によりそれぞれ変異、欠失を調べた。

図 5. IL-12 p40 の結果

BD 群と正常人群で有意差を認めなかった。

図 6. IL-12R  $\beta$  2 の結果

1577AtoG、2799AtoG、2496del91 でいずれも変異、欠失を認めなかった。

**Behcet病におけるT細胞免疫異常(IL-12の関与)** 図 1

- Th1 polarization of the immune response in Behcet disease  
Frassanito MA et al. Arthritis Rheum (1999)
- Systemic levels of the T cell regulatory cytokines IL-10 and IL-12 in Behcet's disease; soluble TNFR-75 as a biological marker of disease activity  
Turan B et al. J Rheumatol (1997)
- Divergent cytokine production profile in Behcet's disease. Altered Th1/Th2 cell cytokine pattern  
Rezzouk S et al. J Rheumatol (1998)

**Genetic polymorphism of IL-12 p40 gene** 図 2

Position 1159, 3' UTR  
3' -TTGTATAGTTAGATGCTAAA-5'  
or  
3' -TTGTATAGTTCGATGCTAAA-5'  
5' ↑  
Taq I site

**Genetic polymorphism of IL-12 p40 gene in immune-mediated disease**  
慢性関節リウマチで行われたSNP解析では正常人の民族間で有意差があったが疾患群と正常コントロールで有意差なし  
MA Hall et al. Genes and Immunity (2000)

**Mutation of the IL-12Rβ2** 図 3

1577A to G (R313G) 5'-AGTGAATCATTTGGGAGCA-3'  
2799A to G (H720R) 5'-CCAGTTTTCAGACGTCCC-3'  
2496 del 91 5'-TTTTGTCTGCAAGGGTGTGTT-3'

Heterozygous mutation			
	1577 A to G	2799 A to G	2496 del 91
Atopic subject (n=75)	1	1	8
Nonatopic subject (n=62)	0	0	0

Matsui et al. Mutation of the IL-12 receptor β2 chain gene in atopic subjects (1999)

**方法** 図 4

IL12p40 • RFLP (Taq I : T I CGA)  
sense primer 5'-TCTATCIGATTCGTTA-3'  
anti-sense primer 5'-TGAACATCCATACATCC-3'

IL12Rβ2 • 1577A to G direct sequencing  
sense primer 5'-GGAAGACATGATTGCTG-3'  
anti-sense primer 5'-CTCTCTCTGGTGTG-3'

• 2799A to G RFLP(Mae II : A I CGT)  
sense primer 5'-CCGCTGGTCATCAGTGAAGTC-3'  
anti-sense primer 5'-GGCCTGATGACCTGGATTC-3'

• 2496 del 91 nested PCR  
outer sense primer 5'-GATGACAGCTCTGACAGCTG-3'  
outer anti-sense primer 5'-GGCCTGATGACCTGGATTC-3'  
inner sense primer 5'-TCCCACGGAAATGAGAGGG-3'  
inner anti-sense primer 5'-AGGCTGCTAGGAGAACAAA-3'

**結果(1)** 図 5

IL12p40 PCR-RFLP(Taq I digestion)

	allele A	allele C	Genotype	AA	AC	CC
Behcet病(n=17)	15	19	Behcet病(n=17)	2	11	4
Control(n=59)	59	59	Control(n=59)	16	27	16

p > 0.05

**結果(2)** 図 6

IL12Rβ2 Direct sequencing

1577 A to G

PCR-RFLP(Mae II digestion)

Heterozygous mutation			
	1577 A to G	2799 A to G	2496 del 91
Behcet病	0 (n=17)	0 (n=17)	0 (n=10)
Control	0 (n=59)	0 (n=54)	0 (n=33)



# 厚生労働科学研究費補助金（特定疾患調査研究事業）

## 分担報告研究

ベーチェット病における Th1 細胞の出現とその役割

分担研究者 鈴木 登（聖マリアンナ医科大学免疫学病害動物学）

ベーチェット病の病態形成には 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。これまでこの Th1 型免疫応答を引き起こす要因は十分明らかではなかった。今回、ヒト熱ショック蛋白 (heat shock protein; HSP) に対する自己免疫応答が Th1 型反応であること、この自己抗原が皮膚病変部やベーチェット病患者白血球に過剰に発現されていること、さらに患者末梢血中の樹状細胞サブセットに偏りがあることを明らかにした。これらの成績は自己反応性 T 細胞、自己抗原発現細胞さらに樹状細胞の異常が組合わさってベーチェット病の病態が形成されることを示唆している。

### A. 研究目的

ベーチェット病 (B 病) の病態形成には 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。我々は B 病患者末梢血単核細胞がヒト熱ショック蛋白 (heat shock protein; HSP) 由来ペプチドに反応して強い増殖反応を示すとともに IL-12、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  を多量に産生することを見出した。さらにこれらの自己反応性 T 細胞では Tec ファミリーチロシンキナーゼの一つで Th1 細胞特異的な転写因子である Txk 蛋白が過剰に発現されており、この細胞が Th1 型サイトカイン

を産生することで B 病の炎症が惹起されると考えられた。今回、B 病患者における Th1 型免疫応答に関わる HSP 発現と抗原提示細胞としての樹状細胞の役割について検討した。

### B. 研究方法

①対象：当院に通院する B 病患者 20 名を対象とした。

②サイトカイン産生能：ヘパリン加末梢血より比重遠心法で単核細胞を回収した。これを非刺激あるいは Hu-18 ペプチドで刺激し産生されるサイトカインを市販の ELISA キットで測定した。

③B病患者末梢血リンパ球のHSP産生はRT-PCR法と免疫染色法で評価した。結節性紅斑の皮膚生検組織におけるHSP産生を免疫組織化学染色法で検討した。対照疾患としてアトピー性皮膚炎患者皮膚組織を用いた。

④フローサイトメトリーによる樹状細胞(DC)の解析：末梢血中のLineage negative, HLA-DR positive, でCD11cとCD123を指標としてDC1細胞とDC2細胞を染色し、フローサイトメーターで解析した。

(倫理面への配慮)

すべての血液・組織供給者に対して研究の目的、方法、予想される結果などを説明し同意を得た上で採血・採取を行った。患者のプライバシーを守るため、サンプルには番号を付けその後の管理と実験を行った。

### C. 研究結果

B病患者末梢血Tリンパ球は60kDaヒトHSP由来ペプチド336-351

(HU-18と呼ぶ)による刺激に反応して強い増殖を示した。B病患者末梢血単核細胞は非刺激状態でIL-12とIFN- $\gamma$ の産生を認めた。この細胞をHU-18で刺激すると大部分の患者でIL-12とIFN- $\gamma$ 等のTh1サイトカインの産生を認めた。B病患者末梢血Tリンパ球は非刺激状態でTh1細胞特異的転写因子Txkを過剰に発現していた。B病患者結節性紅斑の病変部に(皮下の脂肪織を中心に)浸潤するリンパ球もTxkを過剰発現し

ていた。

次にB病患者Tリンパ球の自己抗原であるHSP60が患者の組織において発現しているのかを検討した。

RT-PCR法で検討すると、患者白血球は正常者白血球に比べ明らかに大量のHSP60mRNAを発現していた。免疫組織染色において結節性紅斑の病変部ではHSP蛋白の発現を認めた。一方、アトピー性皮膚炎の組織においてはHSP蛋白の発現は全く認めなかった。

活動性のB病や神経B病の一部では末梢血中のDC1細胞/DC2細胞比率がDC1細胞優位に偏っている症例が認められた(図1)。

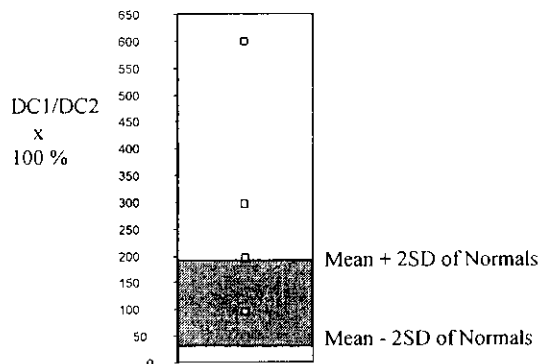


図1. ベーチェット病患者末梢血DC1細胞/DC2細胞比率

### D. 考察

B病ではヒトHSPに反応する自己反応性Tリンパ球が存在し、この細胞はTh1細胞特異的転写因子Txkを過剰に発現するTh1細胞であり、自己抗原による刺激に対して、強い増殖反応とTh1サイトカインの過剰産生

を認め、B 病の病態を形成することが示唆された。実際、B 病の皮膚病変部には Txk を過剰に発現するリンパ球が多数集族し、この細胞が B 病の病態形成に密接に関連することが示唆された。さらに興味深いことは B 病では末梢血白血球が HSP60 を過剰に発現しており、皮膚病変部においても HSP60 を発現する細胞が多数認められることである。即ち B 病では自己抗原は病変部で過剰に発現されており、それに自己反応性の Th1 細胞が反応することで病態を形成すると考えられる。

Th1 細胞の誘導には抗原提示細胞としての DC1 細胞の関与が示唆されている。今回の検討で B 病において DC1 細胞/DC2 細胞比率が DC1 細胞優位に偏倚しており、このため B 病での Th1 細胞偏倚が引き起こされる可能性が示唆された。今回は検討した症例数が限られ今後症例数を増やして検討する必要がある。

#### E. 結論

B 病では白血球と皮膚病変部位において HSP を過剰に発現することが明らかになった。さらに活動性の症例の一部では末梢血中の DC1 細胞の増加が認められた。ベーチェット病では自己抗原の発現亢進があり、それが DC1 細胞により抗原提示されて Th1 細胞機能異常がもたらす可能性がある。今後症例数を増やして詳細に検討する必要がある。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

1. Kasiwakura J, Suzuki N, Takeno M, Itoh S, Oku T, Sakane T, Nakajin S, Toyosima S: Evidence of autophosphorylation in Txk:Y91 is autophosphorylation site. *Biol Pharm Bull* 25(6); 718-721, 2002.
2. Takeba Y, Nagafuti H, Takeno M, Kasiwakura J, Suzuki N: Txk, a member of non-receptor tyrosine kinase of Tec family, acts as a Th1 cell specific transcription factor and regulates IFN-gamma genetranscription. *J Immunol*, 168:2365-2370, 2002.
3. Mihara S, Suzuki N, Takeba Y, Soejima K, Yamamoto Y: Combination of molecular mimicry and aberrant autoantigen expression is important for development of anti-Fas ligand autoantibodies in patients with SLE. *Clin Exp Immunol* 129;359-369, 2002.
4. Nagafuchi H, Takeno M, Takeba Y, Miyagi T, Chiba S, Sakane T, Suzuki N: Aberrant expression of Fas ligand on anti-DNA autoantibody secreting B lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus; "immune privilege" like state of the autoreactive B cells. *Clin Exp Rheumatol* 20; 625-631, 2002.
5. Wakisaka S, Mihara S, Takeba Y,

- Takeo M, Yamamoto S, and Suzuki N: Aberrant fas ligand expression on lymphocytes in patients with Behcet's disease. *Int Arch Allergy Immunol* 129(2);79-84, 2002.
6. Miyagi T, Takeo M, Nagafuchi H, Takahashi M, and Suzuki N: Flk1 positive cells derived from mouse embryonic stem (ES) cells reconstitutes hematopoiesis in vivo in SCID mice. *Exp Hematol* 30(12);1444-1453, 2002.
7. Nagafuchi H, Shimoyama Y, Kashiwakura J, Takeo M, Sakane T, and Suzuki N: Preferential expression of B7.2 (CD86), but not B7.1 (CD80), on B cells induced by CD40/CD40L interaction is essential for the anti-DNA autoantibody production in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 2003;21;71-77.
8. Suzuki N, Takeo M, Inaba, G : Bilateral subdural effusion in a patient with neuro-Behcet's disease. *Ann Rheum Dis*, in press, 2003.
9. Chiba S, Iwasaki Y, Sekino H, Suzuki N: Motoneuron enriched neural cells derived from mouse ES cells reconstitute neural network to improve motor function of hemiplegic mice, a model of cerebral vascular diseases. *Cell Transplant*, in press, 2003.
10. 鈴木登, 山本仁、小坂橋靖: 孤発性と考えられる進行性化骨性筋炎の一例. *炎症・再生* 22(6);555-559, 2002.
11. 宮城司、千葉俊明、鈴木登: 再生医学. *聖マリアンナ医科大学雑誌* 30;121-129, 2002.
12. 千葉俊明、関野宏明、鈴木登: レチノ酸を用いたマウス胚性幹細胞における神経上皮型幹細胞への分化誘導. *炎症・再生* 22(6);543-549, 2002.
13. Suzuki N: The pathogenic role of prolactin in patients with rheumatoid arthritis. *Neuroimmune Biology*, vol.3: Growth and lactogenic hormones (Ed by R Rapaport and Matera) pp.297-304, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2002.
14. Sakane T, Suzuki N: Behcet's syndrome. *The Molecular Pathology of Autoimmunity Second Edition* (Ed by A N Theofilopoulos and C A Bona), pp.828-840, Gordon and Breach Science Publishers, Pennsylvania, USA, 2002.
15. Suzuki N, Takeo M, Takeba Y, Nagafuchi H, Sakane T: Autoimmunity in Behcet's disease. *Immunology of Behcet's disease* (Ed by M Zierhut, S Ohno) Swets & Zeitlinger, Lisse, The Netherlands, in press, 2003.
16. Takeo M, Shimoyama Y, Nagafuchi H, Suzuki N, Sakane T: Neurophil hyperfunction on Behcet's disease. *Immunology of Behcet's disease* (Ed by M Zierhut, S Ohno) Swets &