

- Zeitlinger, Lisse, The Netherlands, in press, 2003.
17. Sakane T, Suzuki N: Neuro-endocrine-immune axis in human rheumatoid arthritis. Autoimmunity Kluwer Academic Publishers, Wroclaw, Poland, in press, 2003.
18. 鈴木登: 免疫不全の分子機構, わかりやすい内科学第2版(井村裕夫編)文光堂, 東京, pp. 310-313, 2002.
19. 鈴木登, 宮城司: 膠原病類縁疾患に伴う関節炎(Behcet病など)「骨・関節疾患」, 朝倉書店 印刷中, 2003.
20. 鈴木登: 全身性エリテマトーデス 病因 インフォームドコンセントのための図説シリーズ 膠原病, 医薬ジャーナル社 印刷中, 2003.
21. 鈴木登: 検査値異常から読む病態と診断計画 リンパ球芽球化試験. 臨床医 28 巻 増刊号 1169-1171, 2002.
22. 武半 優子, 岳野 光洋, 柏倉 淳一, 鈴木登: ヒト Th1 細胞特異的 Tec family チロシンリン酸化酵素, Txk の機能解析と各種自己免疫疾患における発現. 炎症・再生 22(5): 475-479, 2002.
23. 千葉俊明, 鈴木登: 脳梗塞慢性期における移植治療. 救急医 2002; 26(9): 1094-1098.
24. 本間龍介, 鈴木登: 再生医療. Health Science 19(1):78-7, 2002.
25. 宮城 司, 本間龍介, 鈴木登: 呼吸器系の生物学. 1. 胚性幹細胞 (ES 細胞) と実験医学. Annual Review 呼吸器 2003 1-9, 2002.
- 学会発表
1. Miyagi T, Takeno M, Takahashi M, Suzuki N: Hemangioblasts derived from embryonic stem (ES) cells can reconstitute hematopoiesis *in vivo* in SCID. The 31th Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology, 2002.7.
2. Takeno M, Takeba Y, Ishgatubo Y, Suzuki N: Administration of Txk gene selectively induces Th1 type immune receptor, American College of Rheumatology: 65th Annual Scientific Meeting, 2002.10.
3. 千葉俊明, 岳野光洋, 鈴木登, 関野宏明: 虚血型脳外傷モデルマウスにおける ES 細胞由来神経幹細胞の神経再生・保護効果, 第 25 回日本神経外傷学会, 2002. 3.
4. 千葉俊明, 岳野光洋, 鈴木登, 関野宏明: ES 細胞由来神経細胞の脳内移植による神経網修復と機能改善, 第 1 回日本再生医療学会総会, 2002. 4.
5. 千葉俊明, 岳野光洋, 鈴木登, 関野宏明: ES 細胞における神経管形成と液性因子による位置制御, 第 1 回日本再生医療学会総会, 2002. 4.
6. 鈴木登, 岳野光洋: マウス胚性幹細胞・軟骨細胞を用いた関節炎モデルの治療, 第 46 回リウマチ学会学術集

- 会、2002. 4.
7. 岳野光洋、武半優子、鈴木登：Txx 遺伝子治療による Th1 型免疫応答の誘導、第 46 回リウマチ学会学術集会、2002. 4.
8. 千葉俊明、岳野光洋、鈴木登、関野宏明：ES 細胞由来神経幹細胞・血管内皮細胞の同時移植による虚血型脳損傷モデルの修復・機能改善、第 27 回日本脳卒中学会総会、2002. 4.
9. 鈴木登、武半優子、脇坂秀繁、中辻憲夫、仁藤新治：霊長類（カニクイザル）胚性幹細胞（ES 細胞）からの軟骨細胞分化誘導、第 23 回日本炎症・再生医学会、2002. 7.
10. 鈴木登、宮城司、岳野光洋、高橋正知：マウス ES 細胞由来の hemangioblast の移植による SCID マウスの骨髄再建能の検討、第 23 回日本炎症・再生医学会、2002. 7.
11. 武半優子、金子敦史、浅井富明、鈴木登：慢性関節リウマチ (RA) におけるニコチンが神経ペプチドの産生に与える影響、第 23 回日本炎症・再生医学会、2002. 7.
12. 千葉俊明、岳野光洋、関野宏明、鈴木登：ES 細胞における神経管形成の模倣と morphogen による位置制御機構、第 23 回日本炎症・再生医学会、2002. 7.
13. 宮城司、葉俊明、岳野光洋、永渕裕子、鈴木登：ES 細胞の造血系細胞への分化誘導と骨髄移植への応用、第 23 回日本炎症・再生医学会、2002. 7.
14. 千葉俊明、鈴木登、関野宏明：ES 細胞における神経分化と神経再生治療、第 43 回聖マリアンナ医科大学医学会・学術集会、2002. 7.
15. 本間龍介、上野聡樹、鈴木登：マウス胚性幹細胞（ES）の上皮細胞への分化誘導とその角膜移植への応用、第 2 回日本再生医療学会総会、2003. 3.
16. 宮城司、高橋正知、鈴木登：マウス ES 細胞から分化誘導した血液血管芽細胞 (hemangioblast) の特性、第 2 回日本再生医療学会総会、2003. 3.
17. 濱田真里、千葉俊明、明石勝也、青木治人、鈴木登：マウス胚性幹細胞からの神経幹細胞の分化誘導と脊髄損傷における移植治療の有用性、第 2 回日本再生医療学会総会、2003. 3.
- H. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

厚生科学研究費補助金（臨床調査研究事業）

分担研究報告書

ベーチェット病に関する調査研究

研究協力者 太田正穂 信州大学医学部法医学教室講師

ベーチェット病におけるシクロスポリンの治療効果と ABC トランスポーター
遺伝子多型

太田正穂：信州大学医学部法医学教室、勝山善彦：信州大学付属病院薬剤部、
西田朋美、水木信久：横浜市大眼科

研究要旨

T細胞による IL-2 等のサイトカイン産生を阻害することにより、強力な免疫抑制作用を示すシクロスポリンは、ベーチェット病の臨床治療薬として利用されているが、シクロスポリンによる治療効果が総ての患者に見られることはなく、血中シクロスポリンのトラフ値が保たれているにも拘わらず、眼発作回数の改善は見られず、視力低下を伴う患者がしばしば認められる。これらの原因としては、ベーチェット病患者間におけるシクロスポリンの薬物効果に対する薬物応答性の個人差が影響していると考えられる。この個人差をもたらす要因として、薬物動態や薬物感受性に関係する遺伝子の遺伝子多型が示唆され、その中でも薬物動態に関与する薬物代謝酵素チトクロム P450 の遺伝子多型と、薬物排出に関与する ABC(ATP binding cassette; ATP 結合カセット) トランスポーターの遺伝子多型があげられる。今年度はベーチェット病患者におけるシクロスポリンの治療効果と ABC トランスポータースーパーファミリーの一員である MDR1(Multidrug resistance)、MRP1(Multidrug resistance protein)、MRP2/cMOAT 遺伝子の遺伝子多型との相関を調べた。試料として、シクロスポリンによる治療効果が認められたベーチェット病患者 4 名と、治療効果が見られなかった患者 3 名から供与された DNA を用いた。遺伝子多型検査は、MDR1, MRP1, MRP2/cMOAT 遺伝子のエクソン内における非同義置換を示す SNPs を調べ、MDR1 についてはエクソン 1 内における 2 箇所の SNPs とエクソン 12 内の 1 箇所の SNP を、MRP1 についてはエクソン 2,8,9,13,16,20,23,28,31 内における各 1 箇所の SNP を、MRP2/cMOAT については、エクソン 1,10,18,28,31 内にお

る各 1 箇所の SNP を検討した。各遺伝子の目的とするエクソンを増幅するプライマーで PCR により遺伝子増幅を行った後、direct sequencing 法によりシーケンス構造を解析して決定した。MDR1, MPR1, MPR2 の SNP 解析では、シクロスポリンの効果についての個人差が認められなかったが、総てのエクソン部（特に MDR1）についての多型解析をおこなってないため、薬剤有効性についての結論は更に解析を必要とした。また、薬剤代謝酵素チトクロム P450 のサブファミリー CYP3A は、シクロスポリンの代謝と関係があると言われていることから、今後 CYP3A の遺伝子多型とシクロスポリンの薬剤効果との関係についても検討する必要性を得た。

A. 研究目的

T 細胞による IL-2 等のサイトカイン産生を阻害することにより、強力な免疫抑制作用を示すシクロスポリンは、ベーチェット病の臨床治療薬として利用されている。しかし、シクロスポリンによる治療効果が総ての患者に見られることはなく、血中シクロスポリンのトラフ値が保たれているにも拘わらず、眼発作回数の改善は見られず、視力低下を伴う患者がしばしば認められる。これらの原因としては、ベーチェット病患者間におけるシクロスポリンの薬物効果に対する薬物応答性の個人差が考えられる。この個人差をもたらす重要な要因の一つに、薬物動態や薬物感受性に関係する遺伝子の遺伝子多型が示唆され、特に、薬物動態に関与する個人差の原因として薬物代謝酵素であるチトクロム P450 の遺伝

子多型と、薬物排出に関与する ABC(ATP binding cassette; ATP 結合カセット) トランスポーターの遺伝子多型が考えられる。

今回はベーチェット病患者におけるシクロスポリンの治療効果と薬剤排出に関与する ABC トランスポータースーパーファミリーの一員である MDR1(Multidrug resistance)、MRP1(Multidrug resistance protein)、MRP2/cMOAT の遺伝子多型との相関を調べ、これらの遺伝子多型が薬物感受性に関与しているかを検討した。

B. 研究方法

試料として、シクロスポリンによる治療効果が認められたベーチェット病患者 4 名と、治療効果が見られなかった患者 3 名から供与された

DNA を用いた。シクロスポリンの治療効果の代表例を図 1 に示した。

- 1 7 検体の内訳は、シクロスポリンの治療効果が見られた検体が 3 例、治療効果が見られなかった検体が 3 例、さらに治療効果の明らかでないものは 1 例であった。
- 2 遺伝子多型検査は、MDR1 については 3 ヶ所の SNP を、MRP1 については 1 2 ヶ所の SNP を、MRP2 については 6 ヶ所の SNP を検査した。
- 3 SNP 解析は、MDR1、MRP1、MRP2 遺伝子の各エクソンを PCR で増幅後、増幅領域をシーケンスする direct sequencing 法を用いた。
- 4 各エクソンを特異的に増幅するプライマー構造は表 1 に示す。PCR は、50 μ l の反応液中に 100ng のゲノム DNA、2.5pmole の各プライマー、5 μ l の 10x PCR buffer (100mM Tris-HCl, 500mM KCl, 15mM MgCl₂)、0.2mM の各 dNTP、と 1unit の HotStar Taq(QIAGEN 社)を用いて、94°C で 10 分間熱処理後、94°C で 30 秒間熱変性、55°C で 30 秒間アニーリング、72°C で 1 分間伸展反応を 35 サイクル行い、最後

に 72°C で 5 分間反応させた。5 μ l の遺伝子増幅産物を 2%アガロース上で電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色し、UV 照射下で増幅バンドの確認を行い、残りのサンプルについてシーケンス反応を行った。

- 5 シーケンス解析の試料作成は、増幅した PCR 反応産物中のプライマーおよび未反応 dNTP をフィルター (Microcon YN100, ミリポア社)を用いて除去した後、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit(v3.0, ABI) を用いてシーケンス反応を行った。シーケンスプライマーは、PCR に用いたものを各 3.2pmol 使用した。反応後、Sephadex G50 Fine(ファルマシア社)を充填したスピンカラムで余剰の Dye Terminator を除去後、ABI PRISM 377 DNA シーケンサー (ABI 社)を用いて解析した。

C. 研究結果と考察

MDR1, MRP1, MRP2/cMOAT 遺伝子の健常日本人におけるエクソン内の多型性は、Ito ら¹⁾により報告されている。その結果 MDR1 遺伝子では、エクソン 1、12、21、24、26、28 に総数 9 個の一塩基置 (SNP:

single nucleotide polymorphism)が見られ、その内非同義置換 (nonsynonymous substitution) がエクソン 21 と 24 で、総数 3 ヶ所認められている。また、MRP1 遺伝子については、エクソン 2~31 にかけて 12 個の SNPs が見られ、その内非同義置換は 4 ヶ所であった。

MRP2/cMOAT 遺伝子ではエクソン 1、10、18、28、31 に総数 6 個の SNP が見られ、その内 4 ヶ所に非同義置換が認められた。

今回、MDR1, MRP1, MRP2 遺伝子内の各エクソン部の遺伝子増幅は、図 2 に示すように 147bp~339bp にわたる長さのバンドが出現し、既に報告されている増幅産物の大きさと一致していた。

ベーチェット病患者 7 名の MDR1, MRP1, MRP2 遺伝子エクソン内の SNP の解析結果を表 2 に示した。シクロスポリンの治療効果が認められた 3 例（一般にシクロスポリン投与後、眼発作回数が減少、シクロスポリン血中トラフレベルが投与量を減量しているにも関わらず安定し、視力の回復が見られる）と、治療効果が認められなかった 3 例（シクロスポリンを投与後も頻回の眼発作がみられ、シクロスポリン血中トラフ値が保たれているにも関わらず、眼発作回数は減少せず、眼視力の低下を

認めた）、さらにシクロスポリン効果が不明瞭な 1 例について 17 ヶ所の遺伝子多型と治療効果の解析では、特徴的な相違は認められなかった。

体内に投与されたシクロスポリンが全身的な薬物動態（吸収、代謝、排泄）を介して薬物作用分子近傍（T 細胞）に到達し、さらに作用分子（シクロフィリン）と相互作用をした後、薬物効果を発揮するまでの課程に関する要因としていくつかの機能性タンパクの影響が考えられる。この機能性タンパクには、薬物排出や運搬に機能する MDR1, MRP1, MRP2 や、薬物代謝酵素であるチトクロム P450 が挙げられる。いずれの遺伝子も遺伝子多型をしめしており、この遺伝子多型が薬物反応性の個人差に影響を及ぼしていることが推測される。今回の MDR1, MRP1, MRP2 の SNP 解析では、シクロスポリンの効果についての個人差が認められなかったが、総てのエクソン部（特に MDR1）についての多型解析をおこなってないため、薬剤有効性についての結論は更に解析が必要である。また、薬剤代謝酵素チトクロム P450 のサブファミリー CYP3A は、シクロスポリンの代謝と関係があると言われていたことから、CYP3A の遺伝子多型とシクロスポリンの薬剤効果との関係についても検討する必要

があると考えられる。

薬剤動態・作用に影響をおよぼす個人差（遺伝子多型）を検討するには、厳格に選定された症例について解析を行わないと、信頼する結果が得られないであろう。シクロスポリン治療が無効である場合と、有効である場合について考察すると、表3に示したような要因が考えられる。例えば、適切なシクロスポリンの投与量であるのに、薬剤効果が無効である例では、シクロスポリン血中濃度が低い場合と有効値に達している場合が考えられる。特に血中濃度が低い場合は、薬物動態の異常が推定され、その要因としてMDR1, MRP1, MRP2などのトランスポーターの発現量が強いことや活性が高いことが考えられる。それに対して、血中濃度が有効濃度に達しているのに薬剤効果が無効である例では、薬物作用の異常が推定され、その要因としてはシクロスポリン結合核内タンパクの構造変異が推定される。

シクロスポリンは有効な免疫抑制剤として用いられているが、一方副作用も強く発現する。この薬剤の反応性の個人差の大きさが薬物動態に関連していることは否定できない。投薬以前に副作用が起き、薬剤効果が得られない患者さんであることがあらかじめ解っていれば有効な医療

ができ、患者さんにかかる負担も少なくて済むことができる。このように、患者さん個人個人に最も適した薬をもっとも適した量で与える医療すなわち個人最適化医療の実現のためにも更なる検討が必要である。

D. 結論

今回、薬物排出に関与するABCトランスポーターの遺伝子多型MDR1、MRP1、MRP2/cMOATとベーチェット病患者におけるシクロスポリンの治療効果について検討したが、有意な相関は認められなかった。シクロスポリンは有効な免疫抑制剤として用いられているが、一方副作用も強く発現する。この薬剤の反応性の個人差の大きさが薬物動態に関連していることは否定できない。投薬以前に副作用が起き、薬剤効果が得られない患者さんであることがあらかじめ解っていれば有効な医療ができ、患者さんにかかる負担も少なくて済むことができる。このように、患者さん個人個人に最も適した薬をもっとも適した量で与える医療すなわち個人最適化医療の実現のためにも更なる検討が必要である。

E. 参考文献

- 1) Ito S, et al., (2001), Polymorphism of the ABC transporter genes, MDR1, MRP1, and MRP2/cMOA, in healthy

Japanese subjects. *Pharmacogenetics*, 11:175-184.

F. 研究発表
論文発表

1. Mizuki N, Yabuki K, Ota M, Katsuyama Y, Ando H, Nomura E, Funakoshi K, Davatchi F, Chams H, Nikbin B, Ghaderi AA, 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
2. Iizuka M, Katsuyama Y, Mabuchi T, Umezawa Y, Matsuyama T, Ozawa A, Kawada H, Inoko H, Morita E, Ota M. Genetic association analysis using microsatellite markers in atopic dermatitis. *Tokai J Exp Clin Med*, 27: 51-56,2002
3. Asamura H, Ota M, Takayanagi K, Saito S, Tsukada K, Fukushima H. Molecular genetic analysis of the Am phenotype of the ABO blood group system. *Vox Sanguinis*, 83:263-267,2002
4. Makishima H, Ishida F, Ito T, Kitano K, Ueno S, Ohmine K, Yamashita Y, Ota J, Ota M, Yamauchi K, Mano H. DNA microarray analysis of T cell γ -type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. *British J. of Hematology*. 118:462-469,2002
5. Droma Y, Hanaoka M, Ota M, Katsuyama Y, Koizumi T, Fujimoto K, Kobayashi T, Kubo K. Positive association of the endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms with high-altitude pulmonary edema. *Circulation*106:826-830,2002
6. Saito S, Ota S, Seshimo H, Yamazaki Y, Nomura S, Ito T, Miki J, Ota M, Fukushima H, Maeda H. Platelet transfusion refractoriness caused by a mismatch in HLA-C antigens. *Transfusion*, 42:302-308,2002.
7. Tsujimura A, Ota M, Katsuyama Y, Sada M, Miura H, Matsumiya K, Gotho R, Nakatani T, Okuyama A, Takahara S. Susceptibility gene for non-obstructive azoospermia located near HLA-DR and -DQ loci in the HLA class II region. *Hum Genet*, 110:192-197,2002
8. Kawa S, Ota M, Yoshizawa K, Horiuchi A, Hamano H, Ochi Y, Nakayama K, Tokutake Y, Katsuyama Y, Saito S, Hasebe O, Kiyosawa K. HLA-DRB1*0405-DQB1*0401 haplotype is associated with autoimmune pancreatitis in the Japanese population. *Gastroenterology*, 122, 1264-1269,2002.

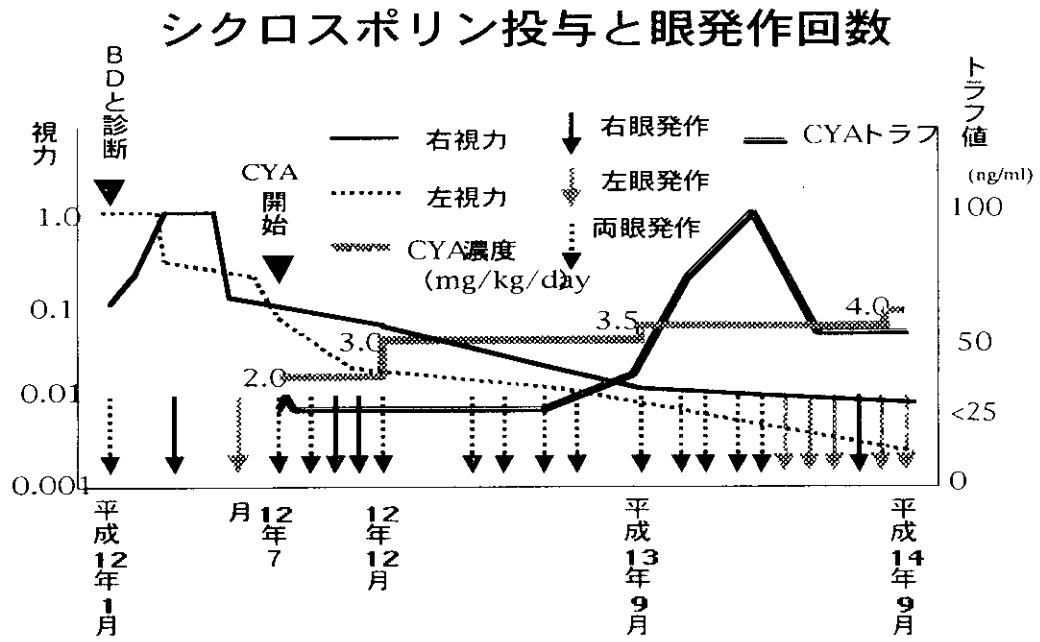


図1 a. シクロスポリン投与効果が見られない症例

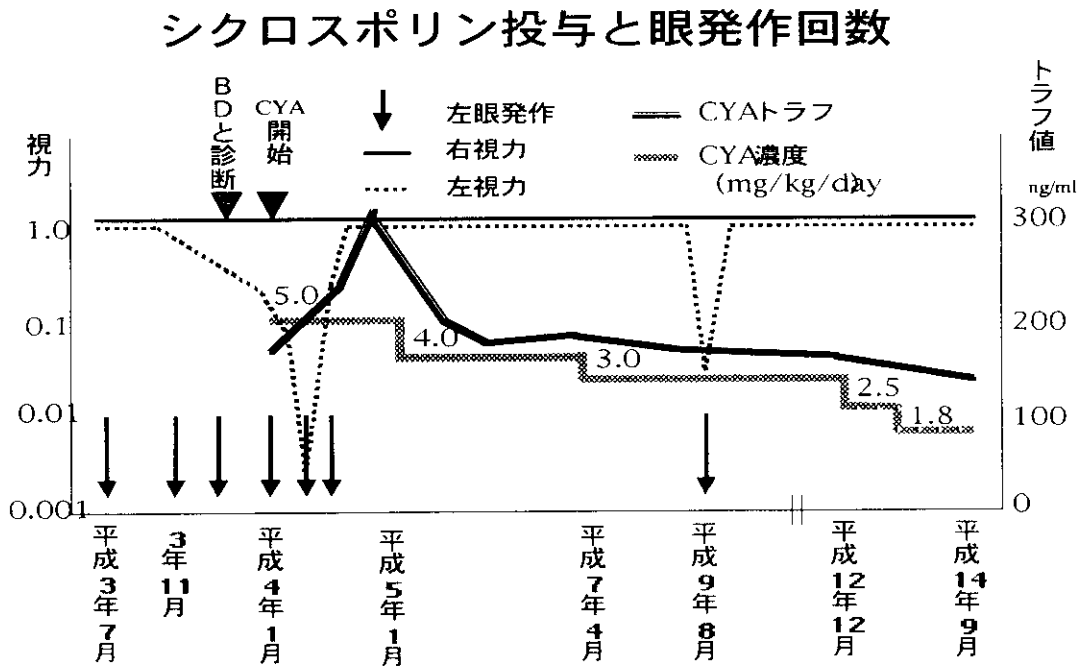


図1 b. シクロスポリン効果が見られた症例

図2 MDR1, MRP1, MRP2遺伝子増幅

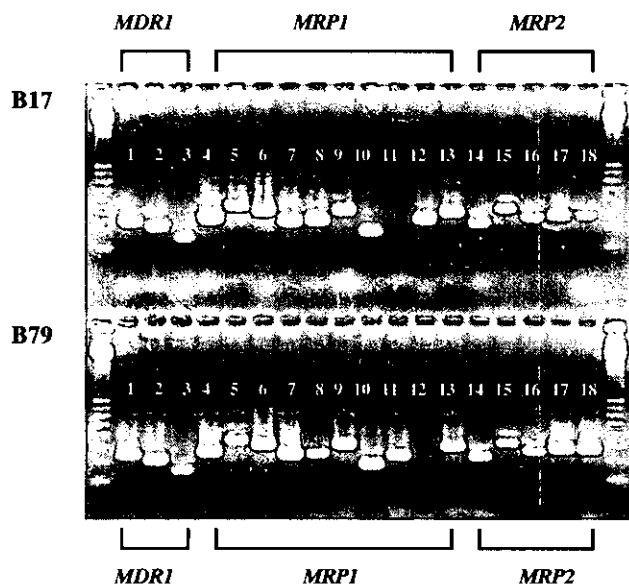


図 No. 1～18 のプライマー組み合わせは表 1 にしめす。

表 1. MDR1,MRP1,MRP2 遺伝子多型解析に用いたプライマー塩基配列

No	Primer	5'-primer	3'-primer	(bp)
1	MD1a/1	TAAATGCGAATCCCGAGAAAA	TCCCGGCCCCGGATTGACTGAA	243
2	MD1g/2	GGTGCAACGGAAGCCAGAACA	GAAGAGCCGCTACTCGAATGA	210
3	MD112/2	TTTTTCTCACGGTCTGGTAG	CATCCCTCTGTGGGGTCATA	147
4	MR12/1	OCTCGOCTGTGTTTTGTGTTG	CCCCGTCCAGGTGCAOCTTCC	255
5	MR18/1	TGGTAGGGGGCTGCATCTCTG	CAAAGCCAAGGAGGGAAAATG	339
6	MR19/1	CCCCACGTGTCACAAGTCAT	CACGCTGGCCCCAGAGTAAOC	308
7	MR113/1	ACTCGGGGCACAGCAGTCAGC	GAAOCCCAAGGCCOCTCTCG	237
8	MR116/1	TAGOOOGGCAGGCTCATTCA	AGCTTTTCTCAGACCAOCAG	240
9	MR117/1	GTGGGOCAGCTGTTGTCTOGT	GCGGCAACAGCTGACTGATTC	299
10	MR120/1	CCCCACTTGCCCCCTTTGTCT	CTGGCAGGGCAGGGTCTTAG	172
11	MR123/1	TGCTGGTCAAGCTCCCTCTCT	TCCA CTGTGTCCA GCTCCTTG	226
12	MR128/1	GCCAGCATTCOCCACACACT	GCTTGCCAGCTCTGGCTCAC	244
13	MR131/1	ACTTGCCOCAGGTCAAGTGTCC	AGTGTGGGAGGCTTGGTTTAC	285
14	MR21/1	CTGTTCCACTTTCTTTGATGA	TCTTGTTGGTGAOCCOCTAA	210
15	MR210/1	GGGTCTAATTTCAATCCTTA	TATTCCTCTGGGTGACTTTT	310
16	MR218/1	GGAGTAGTGCTTAATATGAAT	OCCACCCOCTTTATATCTT	249
17	MR228/1	TGCTACCTTCTCCTGTTCTA	ATOCAGGCTTCTTCACTCC	269
18	MR231/1	AGGAGCTAACACATGGTTGCT	GGGTAAAGCCATCCGTGTCAA	272

表2 ベーチェット病患者におけるMDR1,MRP1,MRP2 遺伝子多型

Primer	Location	Position n.c.	Position a.a	Patient No								Wild Type
				17	82	122	9	12	114	79		
				E	E	E	NE	NE	NE	D		
MD1a/1	promoter	A-41aG	-	A	A	A	A	A	A	A	A	A
MD1g/2	G-box	C-145G	-	C	G/C	C	G/C	C	C	C	C	C
MD112/2	Exon 12	T1236C	Gly412Gly	C	T	T/C	T/C	T	C	T	T	T
MR12/1	Exon 2	G128C	Cys43Ser	G	G	G	G	G	G	G	G	G
MR12/2	Exon 2	C218T	Thr73Ile	C	C	C	C	C	C	C	C	C
MR18/1	Exon 8	T825C	Val275Val	T	T	C	T	T/C	T	T	T	T
MR19/1	Exon 9	T1062C	Asn354Asn	T	T	C	T	T/C	T	T	T	T
MR113/1	Exon 13	T1684C	Leu562Leu	C	C	C	T	C	C	C	C	T
MR116/1	Exon 16	C2007T	Pro669Pro	C	C	C	C	C	C	C	C	C
MR117/1	Exon 17	G2168A	Arg723Gln	G	G	A/G	G	A/G	G	G	G	G
MR120/1	Exon 20	C2665T	Pro889Pro	C	C	C	C	C	C	C	C	C
MR120/1	Exon 20	T2694C	Asn898Asn	T	T	T	T	T/C	T	T	T	T
MR123/1	Exon 23	G3173A	Arg1058Gln	G	G	G	G	G	G	G	G	G
MR128/1	Exon 28	G4002A	Ser1334Ser	G/A	G	G	G	A/G	G/A	G/A	G/A	G
MR131/1	Exon 31	C4524T	Tyr1508Tyr	C	C	C	C	C	C	C	C	C
MR21/1	promoter	C-24T	-	C	C	C	C	C	C	C	C	C
MR210/1	Exon 10	G1249A	Val417Ile	G	G	G/A	G	G	G/A	G	G	G
MR218/1	Exon 18	C2302T	Arg768Trp	C	C	C	C	C	C	C	C	C
MR218/1	Exon 18	C2366T	Ser789Phe	C	C	C	C	C	C	C	C	C
MR228/1	Exon 28	C3972T	Ile1324Ile	C	C	C	T/C	C	C	C	C	C
MR231/1	Exon 31	G4348A	Ala1450Thr	G	G	G	G	G	G	G	G	G

E:effective, NE:non effective, D:doubtful

表3 シクロスポリンの薬剤効果と推定される要因

作用	投与量	血中濃度	要因	
無効	規定量	低い	1. 吸収率が悪い	MDR1 の発現量と活性が高い
			2. 代謝が早い	患者の腸管の状態 CYP3A の発現量と活性が高い ヘマトクリットが低い 血球内濃度が低い 血中リポ蛋白の濃度が低い CYP3A5 の影響 (日本人は不活性の変異タイプが多い)
		有効値	1. 細胞内に取り込まれない	トランスポーター、タイトジャンクション
			2. 細胞内でターゲットとの結合が弱い	シクロフィリン、カルシニューリン、IKB 等
			3. ターゲットの立体構造異常	シクロフィリン、カルシニューリン、IKB 等
4. 免疫系の変化	抗原の強弱、患者の状態			
5. 均一な疾患か？				
作用	投与量	血中濃度	要因	
有効	規定量	有効値		
	多い	有効値	1. 吸収率が悪い	MDR1 の発現量と活性が高い 患者の腸管の状態
			2. 代謝が早い	CYP3A の発現量と活性が高い ヘマトクリットが低い 薬物相互作用—CY3A を誘導する薬剤が投与されている
	少ない	有効値	代謝が遅い	肝障害がある CY3A の発現量が低い CY3A の活性がない 薬物相互作用 吸収率が良い (MDR1 活性が低い)
		低い	1. 細胞内に取り込まれ易い	トランスポーター、タイトジャンクション
2. 細胞内でターゲットとの結合が強い			シクロフィリン、カルシニューリン、IKB 等	
3. ターゲットの立体構造異常	シクロフィリン、カルシニューリン、IKB 等			
4. 免疫系の変化	抗原の強弱、患者の状態			
5. 均一な疾患か？				

ベーチェット病患者口腔由来 *Streptococcus sanguis* の菌体成分によるブドウ膜炎誘導と CAP18 合成ペプチドによる発症抑制に関する研究

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
研究協力者	磯貝 浩	札幌医科大学医学部実験動物施設
	平田陸正	まつぞの薬局自然免疫研究所
	松尾幸毅	産業技術総合研究所
	小熊恵二	岡山大学医学部細菌学教室
	大野重昭	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
	東條理子	福島県立医科大学医学部皮膚科
	金子史男	福島県立医科大学医学部皮膚科

研究要旨

好中球や粘膜上皮細胞由来の殺菌ペプチドは感染防御に重要な役割を担っていると考えられている。Cathelicidin ファミリーの 18 kDa 塩基性抗菌蛋白 (CAP18) はベーチェット病患者口腔由来 *Streptococcus sanguis* に対して強い抗菌活性を示した。CAP18 は細胞壁に結合し、細胞壁によるサイトカイン誘導活性を阻害した。本菌由来の細胞壁は眼内に投与することによってブドウ膜炎を起こすことができる。CAP18 合成ペプチドはブドウ膜炎惹起を中和した。

A. 研究目的

好中球や粘膜上皮細胞には低分子の殺菌ペプチドが存在し、感染防御に重要な役割を果たしている。Cathelicidin の仲間である 18 kDa の塩基性抗菌蛋白 (CAP18) はベーチェット病患者口腔由来 *Streptococcus sanguis* に対して強い抗菌活性を示すことを報告した。そこで、本菌由来の細胞壁のブドウ膜炎誘導活性を CAP18 合成ペプチドが中和するかどうかが調べた。

B. 研究方法

合成ペプチドとしては CAP18 活性ドメイン (FRK SKEKIGKEFK RIVQRIKDFL RNLV : V38) およびフェニルアラニン置換体 (FF) を用いた (Fig.1)。ペプチドの合成はペプチド研究所に依頼した。細胞壁 (CW)、リポタイコ酸 (LTA) および MDP のブドウ膜炎誘導活性は前眼房内直接投与後 24 時間目にマウスモデルを

用いて調べた。マウスに各コンポーネント 1 mg/ml の水溶液 (HBSS, pH7.4) を 2 μ l 投与し、組織を調べるとともに IL-6 の定量を行った。それぞれの菌体コンポーネントの中和は 2 mg/ml の CAP18 ペプチドを同濃度のコンポーネント水溶液と混和し、直後にマウスに投与した。マウスは ICR (SPF, ♂, 5 週齢) を 1 群 5 匹として使用した。

C. 研究結果

マウスの眼房内に直接、CW、LTA あるいは MDP を投与したところ、好中球の浸潤を中心とした炎症がすべてのマウスに惹起できた。CW や LTA の炎症はおもに虹彩毛様体からブドウ膜に及ぶものであった。この炎症は V38 および FF どちらの合成ペプチドを用いても抑制することができた (Fig.2)。5 匹中 4 例はほぼ完全に抑制が可能であったが、1 例ずつはわずかな好中球の浸潤を認めた (Fig.3)。

一方、MDP による炎症はこれらのペプチドによって抑制されなかった。同様に、炎症惹起を起こすペプチド Brn-3b による炎症は合成ペプチドによって抑制できなかった。

CW や LTA が大腸菌由来の LPS(O111:B4)に比べて、サイトカイン誘導能がどの程度異なるかを静脈内投与でまず調べた。Fig. 4 に示されるようにその活性は CW で約 1/20、LTA で約 1/50 であった。CW, LTA, MDP を眼内投与すると IL-6 が眼房水中に検出された。CAP18 ペプチド (FF) は IL-6 の産生誘導を CW および LTA 投与郡で抑制した (Fig. 5)。

D. 考察：CAP18 はプラスに荷電した塩基性の領域と疎水性の領域を持つ両親媒性の分子である。活性としては LPS 結合活性を示すだけでなく、細胞壁や LTA への結合も示し、生体内でもその効果を発揮した。菌体コンポーネントの活性中和を介して、ブドウ膜炎の局所での発症抑制を抑えることは 1) 治療薬としての展望、2) 特定患者における CAP18 の発現と病態との関連性を考える上で興味深い。*S.sanguis* 由来の CW をはじめとする菌体コンポーネントは直接それを眼内投与することによってブドウ膜炎を誘導することができる。CW や LPS などの細菌表層の成分はそのものに蛋白毒素のような活性はないものの、宿主の免疫系を刺激し、過剰なサイトカイン誘導を起こす。LPS と *S.sanguis* 由来の CW を比べてみると IL-6 誘導能は後者が約 1/20 であった。感受性の高い宿主やある種の条件では CW による実験的ブドウ膜炎も可能であろう。一般に静脈内投与などで LPS がよく使用されおり、炎症惹起という観点からブドウ膜炎の発症を考えることができる。

E. 結論

1) ベーチェット病患者口腔由来 *S.sanguis* の菌体成分はブドウ膜炎を誘導する。

2) CAP18 活性ドメインは上記の炎症を抑制する。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

著書

1. 磯貝恵美子：犬のライム病。動物の感染症(分担執筆)、P. 326-327, 近代出版、2002
2. 磯貝恵美子：レプトスピラ。細菌学。P. 614-619、朝倉書店、2002

総説

原著

1. Suzuki, K., Kokai, Y., Sawada, N., Takakuwa, R., Kuwahara, K., Isogai, E., Isogai, H., and Mori, M. *SS1 Helicobacter pylori* disrupts the paracellular barrier of the gastric mucosa and leads to neutrophilic gastritis in mice. *Virchows Arch.* 440: 318-324, 2002.
2. Tanaka, M., Isogai, E., Isogai, H., Hayashi, S., Hirose, K., Kimura, K., Sugiyama, T., and Sato, K. Synergistic effect of quinolone antibacterial agents and proton-pump inhibitors against *Helicobacter pylori*. *J. Antimicrob. Chemother.* 49: 1039-1040, 2002
3. Nishikawa, T., Isogai, E., Isogai, H., Ohba, T., Kimura, K., Doi, Y., Satoh, M., Yoshida, R., Okayasu, T., and

- Arashima, S. Inhibition of Growth and toxin production in enterohemorrhagic *Escherichia coli* by tea and catechin drinks. *Japanese J. School Health.*, 43, 100-102, 2002
4. Kobayashi-Sakamoto M, Isogai E. Hirose K. *Porphyromonas gingivalis* modulates the production of interleukin 8 and monocyte chemotactic protein 1 in human vascular endothelial cells. *Current Microbiology.* In press
 5. Tomoyasu, T., Takaya, A. Isogai, E., and Yamamoto, T. Turnover of FlhD and FlhC, master regulator proteins for *Salmonella* flagellum biogenesis, by the ATP-dependent ClpXP protease. *Molecular Microbiol.* 2002, In press
 6. Isogai, E., Isogai, H., Kotake, S., Ohno, S., Ishihara, M., Aoki, K., Tojo, M., Kaneko, F., Yokota, K., Oguma, K. Antibody cross reactivity from sera of patients with Behcet's disease with synthetic peptides that have homologies with protein from *Streptococcus sanguis*. *J. Appl. Res.* 2 (3), 1-7, 2002
2. 国際学会発表
1. Kobayashi S. M., Isogai, E., Mizugai, H., Hirose, K. *Porphyromonas gingivalis* proteases degradate IL-8 and MCP-1 secreted by human endothelial cells. IADR, 80th General Session & Exhibition, San Diego, USA, 2002.
 2. Kawahara, M., Rikihisa, Y., Isogai, E., Takahashi, M., Misumi, H., and Suto, C. New 16S rRNA and groEL gene sequences which don't belong to known clades in the family Anaplasmataceae detected in *Rattus norvegicus* rats and *I. ovatus* ticks in Japan. 102th General Meeting of ASM, Salt Lake City, USA, 2002
 3. Isogai, E., Hirata, M., Isogai, H., Matsuo, K., Kimura, K., Yokota, K., Oguma, K., Tojo, M., Kaneko, F., Kotake, S., and 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 June 27-29, 2002
 4. Tojo, M., Zheng, X., Oyama, N., Isogai, E., Nakamura, K., and Kaneko, F. Detection of microbial DNA in skin lesions from patients with Behcet's disease. 10th International Conference on Behcet's disease, Berlin June 27-29, 2002
 5. Tanaka, A., Tomoyasu, T., Ohkishi, T., Ukyo, Y., Isogai, E., and Yamamoto, T. Modulation of the flagellar master regulator, FlhDC, by the ClpXP protease in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. IMUS, Paris, France, July 21 – August 1, 2002
- H. 知的財産権の出願、登録状況特記事項なし。

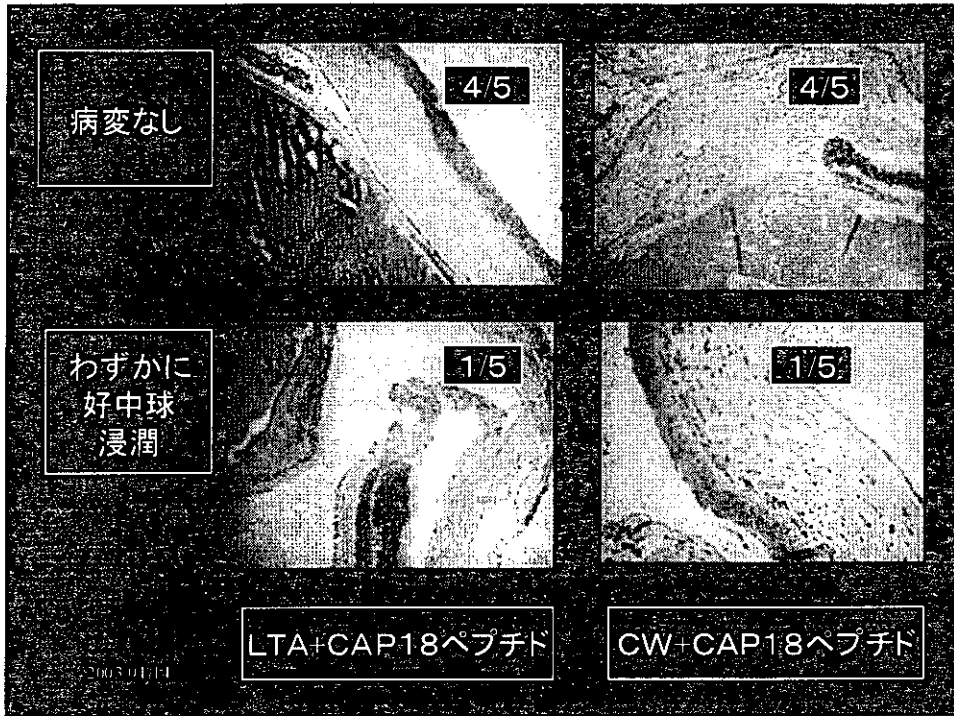


Fig.3 CAP18 合成ペプチドによる病変抑制のパターン

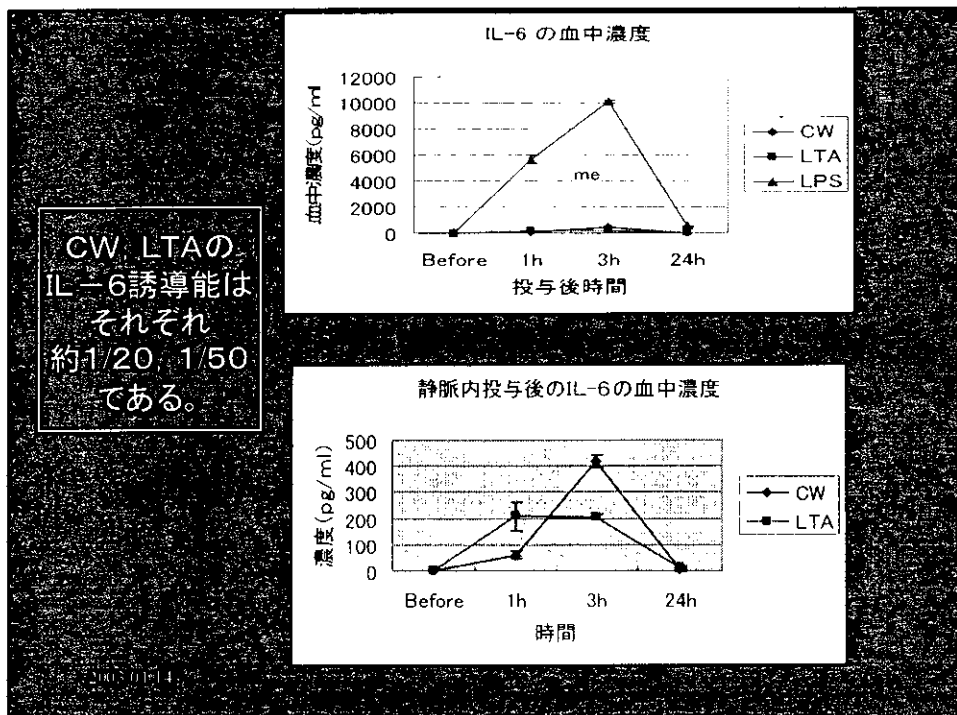


Fig.4 静脈内投与時の CW および LTA の IL-6 誘導能

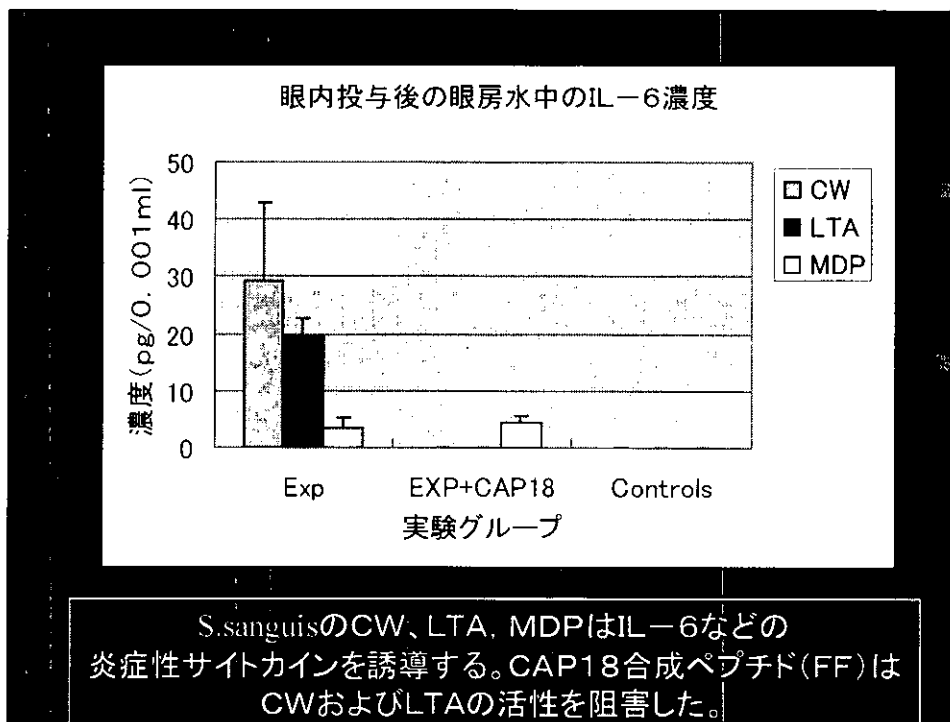


Fig.5 CAP18 合成ペプチドの中和による CW および LTA の IL-6 誘導阻害

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

Heme Oxygenase (HO)-1 誘導による炎症制御
—ベーチェット病の新たな治療戦略—

分担研究者 石ヶ坪良明 (横浜市立大学医学部 内科学第一講座)
共同研究者 岳野 光洋 (横浜市立大学医学部 内科学第一講座)
武田由希子 (横浜市立大学医学部 内科学第一講座)

HO-1 は種々のストレスにより誘導されるヘム分解酵素で、その代謝産物の CO、ビリルビンによる抗酸化作用、抗アポトーシス作用、サイトカイン産生修飾作用を介して炎症制御に働く可能性が示されている。本年度、我々は HO-1 誘導による炎症性蛋白の発現制御を *in vitro* で検討し、マウス *airpouch* 炎症モデルを用いて、HO-1 発現誘導の炎症への影響を解析した。

マウス脾細胞は *in vitro* でも *in vivo* でも hemin 処理により HO-1 の発現が誘導されることが確認された。また、ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) の検討では、HO-1 発現の主体は CD14 陽性単球系であった。hemin 処理により HO-1 を誘導したマウス脾細胞では LPS 刺激に誘導される COX-2、iNOS の発現が抑制され、また TNF- α 産生も抑制されたが、IL-10 はむしろ増強した。

次に、マウス背部皮下 *airpouch* 内の LPS 誘発性炎症に対する hemin の効果を検討したところ、hemin を *airpouch* 内に投与することにより局所に HO-1 発現が誘導され、LPS 刺激による好中球をはじめとした炎症細胞浸潤は軽減した。以上の知見は HO-1 の発現誘導により、炎症性メディエーター、炎症性サイトカインの産生などが抑制され、炎症が制御される可能性を示したものであり、ベーチェット病の新たな治療戦略の一つとしても期待できるものと思われた。

A. 研究目的

Heme Oxygenase (HO) はヘムを CO とビリベルジンに分解する酵素で、二つの isozyme がある。HO-2 は構成的に発現しているが、HO-1 は酸化ストレス、サイトカインなど種々の刺激によって誘導されるストレス蛋白である。この代謝過程で生成された CO は、

細胞内刺激伝達経路の cGMP や p38MAP の経路に作用し、アポトーシスの抑制や炎症性サイトカイン産生の制御を介して細胞保護作用を発揮することが知られている。一方、ビリベルジンはすみやかにビリルビンに転換され、抗酸化作用をもたらす。これらの作用から予測されるとおり、呼吸器、循環

器、神経系などの様々な臓器の疾患の病態に関与していることが解明されており、我々の研究室からもマウスモデルを用いて、肺の炎症性疾患や線維症に対し、HO-1 遺伝子発現アデノウイルスベクターの投与が有効であることを報告している。さらに、最近、IL-10 の抗炎症性作用機序に HO-1 の発現誘導による CO 産生が関与していることが報告され、炎症の制御蛋白としても脚光を浴び始めた。このような背景をもとに、今回、我々は、HO-1 の発現誘導および HO-1 遺伝子療法がベーチェット病 (B 病) における急性炎症の制御にも応用できる可能性を検討した。

B. 研究方法

①対象： Balb/c マウス (6-8 週令、雌) および健康成人。

(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。

②細胞分離：ヘパリン加ヒト末梢血よりフィコールを用いた比重遠心法により、単核細胞および多核白血球を分離した。単核細胞はマグネットソーティングにより CD3+CD20+リンパ球、CD14+単球に分画した。

③細胞培養：マウス脾細胞あるいはヒト末梢血単核細胞、多核白血球に HO-1 誘導剤である hemin を添加し、12 時間ないしは 24 時間培養して回収した。また、マウス脾細胞を 12 時間 hemin で前処理後、LPS で 24 時間刺

激し、細胞および培養上清を回収した。

④airpouch 炎症モデル：マウス背部皮下に滅菌空気を注入して airpouch を作成後、LPS 投与により局所炎症を惹起した。このモデルにおいて、前処理として hemin を腹腔内、airpouch 内に投与し、airpouch の壁の病理学的所見を検討した。

⑤ウェスタン法：培養細胞あるいはマウス脾細胞の cell lysate あるいは airpouch 壁組織のマイクロゾーム分画を SDS-PAGE で泳動後、ニトロセルロース膜に転写して、HO-1、COX-1、COX-2、iNOS に対する特異抗体を用いた Western 法によりそれぞれの蛋白の発現を解析した。

⑥免疫染色法：ヒト末梢血白血球、マウス組織を対象として抗 HO-1 抗体を用いた免疫染色法により、HO-1 発現細胞を同定した。

⑦ サイトカイン産生：マウス TNF- α 、IL-10 は ELISA 法により解析した。

C. 研究結果

①hemin による HO-1 の発現の誘導：まず、マウス脾細胞を *in vitro* で hemin 処理し、HO-1 の発現をウェスタン法により回収した。マウス脾細胞は回収時にわずかに HO-1 を発現しているが、hemin 処理により著明に増強する (図 1(A))。hemin を腹腔内投与して 12 時間、24 時間後に脾細胞を回収した場合にも強い HO-1 の発現が誘導されるていた (図 1(B))。

ヒト末梢血白血球を比重により単核細胞と多核白血球に分けて、それぞ