

図1 CYA の薬物動態と作用機序

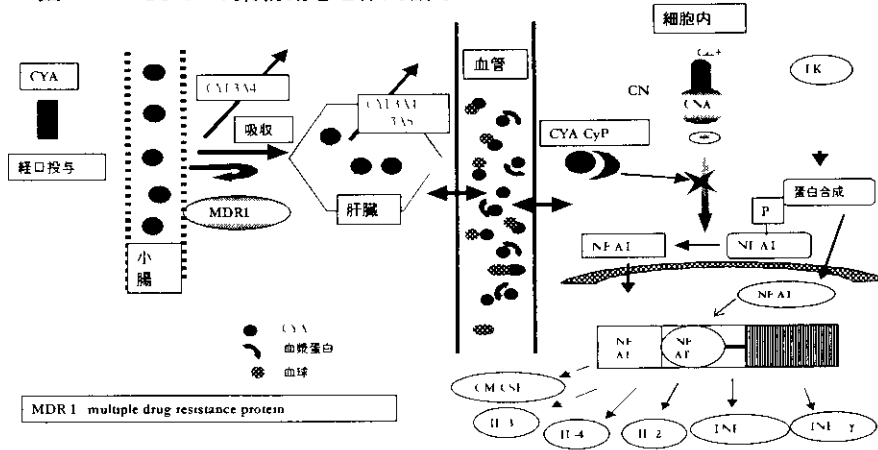


図2 CYP3A5*3 と CYP3A5*6 の PCR-RFLP 解析

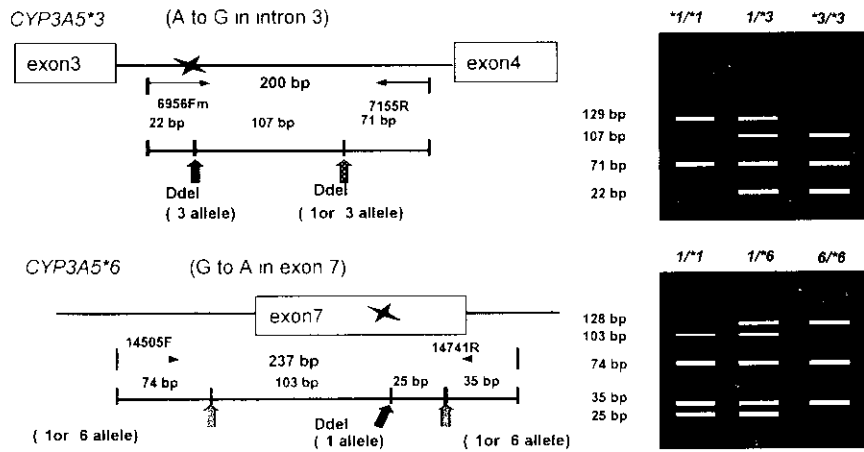


図3 CYP3A4 エクソンの PCR

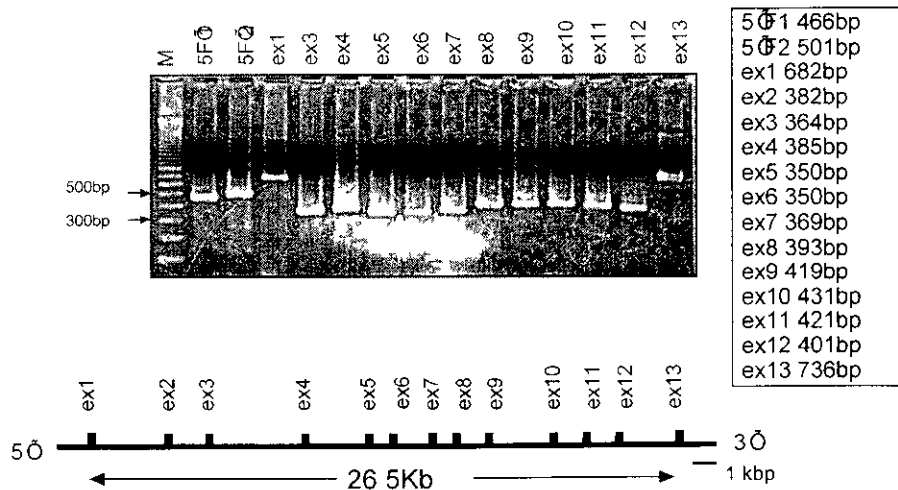


表1 CYP3A4のアリル

Allele	Protein	cDNA	Nucleotide changes		Exon	Effect
			DNA	DNA		
CYP3A4 1A	CYP3A4 1	None	None	None	1	
CYP3A4 1B	CYP3A4 1		392 A>C		1	
CYP3A4 1C	CYP3A4 1		444 T>G		1	
CYP3A4 1D	CYP3A4 1		62 C>A		1	
CYP3A4 1E	CYP3A4 1		362 T>A		1	
CYP3A4 1F	CYP3A4 1		747 C>C		1	
CYP3A4*2	CYP 3A2				7	S222P
CYP3A4 3	CYP3A4	154 T>C			11	M44>T
CYP3A4 4	CYP3A4 4	7 A>C			4	H18V
CYP3A4 5	CYP3A4 5	65 C>G			7	P318R
CYP3A4 6		831 ins A				frameshift
CYP3A4 7	CYP3A4 7	167 G>A	6004 G>A		1	G57D
CYP3A4 8	CYP3A4 8	87 C>A	13308 G>A		4	R130Q
CYP3A4 9	CYP3A4 9	08 G>A	14292 C>A			V170I
CYP3A4 10	CYP 3A10	70 G>C	14304 C>C			D174H
CYP3A4 11	CYP3A4 11	1088 C>T	21877 C>T		10	T363M
CYP3A4 12	CYP3A4 1	1117 C>I	21876 C>T		10	L 73F
CYP3A4 13	CYP3A4 1	147 C>T	27026 C>T		11	P416I
CYP3A4 14	CYP3A4 14	44 T>C	44 T>C		1	E15P
CYP3A4 15A	CYP3A4 15	485 G>A	14267 G>A		5	R16 Q
CYP3A4 15B	CYP3A4 1	845 insATCCAC TGA 72 A G 485 G A	845 insA1GGAGTGA 577 A>G 14269 C A			R16 Q
CYP3A4 16	CYP3A4 16	554 C G	15603 C C		6	I185S
CYP3A4 17	CYP3A4 17	56 C L C	15715 T>C		6	F183S
CYP3A4 18	CYP3A4 18	878 T>C	20072 T>C		8	I233P
CYP3A4 19	CYP3A4 19	1522 C T 1510 12 G>A	3737 C T 20 30 C>A		19	P467S

図4 CYP3A5*3,*6 タイピング 結果と日本人遺伝子頻度

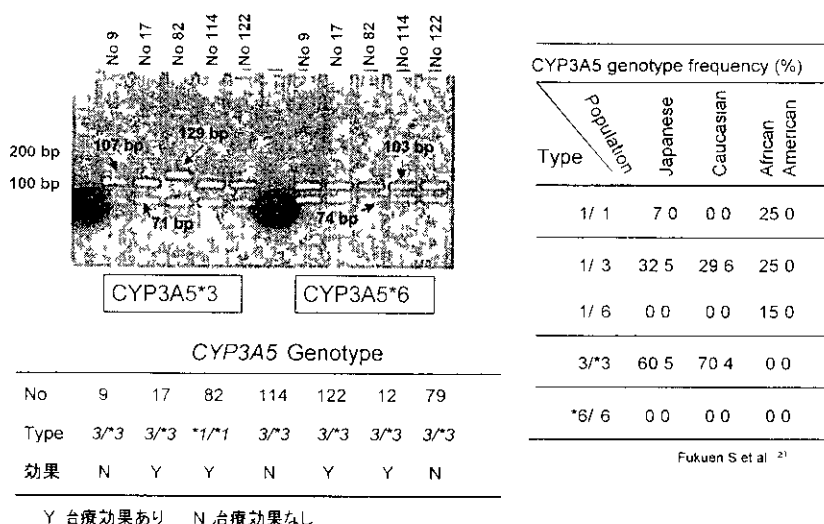


表2 シクロホリン治療を受けた患者における CYP3A4 遺伝子エクソン内シーケンス構造

検体	効果	エクソン内塩基配列													備考	
		EX1	EX2	EX3	EX4	EX5	EX6	EX7	EX8	EX9	EX10	EX11	EX12	EX13		
B9	N	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	
B12	N	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	
B114	N	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	
B17	Y	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	Int3 22 A→G (AG)Het、Int9 109-
B79	Y	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	Int3 22 A→G (AG)Het
B82	Y	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	Int10 12 G→A(AA)HOMO
B122	Y	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	Int10 12 G→A(GA)Het

W Wild Type

N シクロホリン治療効果なし Y シクロホリン治療効果あり

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
分担研究報告書

ヘーチェット病に関する調査研究

難治性ふとう膜炎に対するステロイド徐放薬の眼内投与についての検討

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

研究要旨

これまでに我々はふとう膜炎の局所治療法としてステロイド薬の局所投与を行ってきた。その方法としては、点眼、結膜下注射、後部テノン下注射であるか、それぞれに利点と欠点がある。新しい投与方法として徐放薬の硝子体内在入、あるいは眼内埋植という方法がこのところ多方面で試みられ、その安全性が確立されるとともに、予想される副作用なども徐々にわかってきている。

当科では難治性ふとう膜炎に対してトリアムノロンアセトニド4mgの硝子体内在入を3例3眼に、フルオンロンアセトニド眼内埋植を1例1眼に行ったところ、それぞれ有効であった。しかし、中には一時的に眼圧上昇を認めた症例、白内障が増強した症例がみられた。

今後これらの方法がヘーチェット病を含む難治性ふとう膜炎の炎症発作時の消炎の方法として、あるいは炎症発作抑制の方法として取り入れられていくと思われる。

A 研究目的

ヘーチェット病を含むふとう膜炎の治療法にはステロイド薬の局所投与が多く使われている。現在一般的に行われている方法は点眼、結膜下注射、後部テノン囊下注射であるか、新たに眼内埋植(インプラント)(図1)および硝子体内在入(図2)が最近注目されている。

長期間のステロイド薬内服によりステロイド薬による副作用が全身にみられるようになる症例をよく経験するか、その場合、できるだけ眼局所でのステロイド投与が全身への副作用が少ない点で望ましい。これまでの一般的な眼局所へのステロイド薬の投与方法である点眼、結膜下注射、後部テノン囊下注射はいずれも、作用期間が短い、眼内移行が少ないといった欠点が見られた。

今回我々はステロイド徐放薬の眼内埋植(インプラント)および硝子体内在入についてその有用性および副作用について検討した。



〔図1〕 眼内埋植 (インプラント)

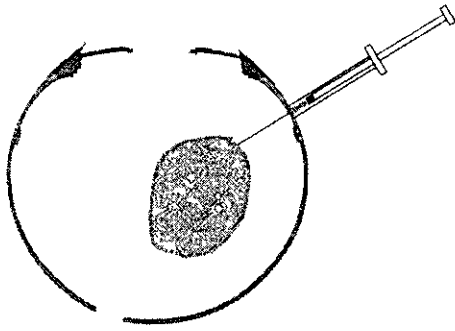


図2 硝子体内注入

B 研究方法

インプラントを1例に、硝子体内注入を3例に行った。インプラント、硝子体内注入いずれも、その期待できる有効性、方法、考えられる副作用、危険性について説明文書を用意して良く説明し、同意を得て行った。

C 研究結果

<インプラント>

症例 60才 女性

平成 13 年ふとう膜炎(両)発症し精査の結果サルコイトーシスと診断された。その後ステロイド薬内服するも漸減する度に再発、ステロイド薬増量を繰り返してきたため、満月様顔貌、骨粗鬆症などの副作用が出現してきた、しかし、硝子体混濁、嚢胞様黄斑浮腫が依然強くみられるため(図3)、平成 14 年 11 月 5 日左眼にフルオノロン眼内埋植を行った。



図3 インプラント前
両眼の硝子体混濁 嚢胞様黄斑浮腫がみられる

埋植後は左眼の硝子体混濁、嚢胞様黄斑浮腫は改善されたか、左眼の後嚢下白内障が増強してきたため平成 15 年 8 月 5 日白内障摘出術+眼内レンズ挿入術を施行。

術後も炎症の増悪なく硝子体混濁、嚢胞様黄斑浮腫は消失した(図4)。



図4 インプラント後

左眼インプラント1年後の眼底。右眼では硝子体混濁 嚢胞様黄斑浮腫が残存しているが インプラントを行った左眼では消失している。

<硝子体内注入>

症例1 24才男性

平成 14 年 11 月両眼のふとう膜炎を発症。閉塞性網膜血管炎を合併し、前房水より結核菌 DNA を検出し結核性ふとう膜炎の診断。硝子体出血(右)に対し硝子体手術を施行したか、術後も強い黄斑浮腫が続いたため平成 15 年 11 月 4 日 トリアムノロン 4mg 硝子体内注入(右)を行った。注入後2週間後に眼圧上昇がみられたか、点眼にてコントロールされた。黄斑浮腫は著明に改善した。

症例2 50才 女性

前述のインプラントを行った症例であるか、インプラントをした左眼は消炎したか、右眼の硝子体混濁、嚢胞様黄斑浮腫の改善がみられないため平成 15 年 11 月 14 日 トリアムノロン 4mg 硝子体内注入(右)を行った。注入後4週後より眼圧上昇がみられたか、点眼 内服により眼圧コントロールされた。硝子体混濁、黄斑浮腫は著明に改善した。

症例3 34才 男性

平成 11 年ヘーチェット病を発症。以後眼炎症発作を繰り返し、ンクロスポリン内服、アタカム治療を行うも発作を抑制できないため平成 15 年 11 月 28 日 トリアムノロン 4mg 硝子体内注入(右)を行った。注入後2週間目に一時的に眼圧上昇がみられたか、点眼にてコントロールされた。注入後また2ヶ月しか経過していないか、眼炎症発作は生していない。

D 考察

両治療共に眼内に直接徐放性ステロイド薬

を投与する方法であり、従来の局所投与法に比べて、以下の利点かあると考えられる。

- 1、長期にわたる有効性(インプラントでは3年間、硝子体内注入では半年)
- 2、網膜、脈絡膜への有効性が高い
- 3、眼炎症発作の抑制

しかし、以下の副作用が懸念される。

- 1、ステロイド白内障
- 2、眼圧上昇(緑内障)
- 3、眼内感染症

高頻度に副作用が出現することか予想され、安易に選択するべき治療法ではないか、有効性は高く、難治な症例を良く選んで用いる治療方法であると思われる。

E 結論

ヘーチェット病を含む難治性ぶどう膜炎の治療方法として、徐放性ステロイド葉の眼内埋植、硝子体内注入は有効な治療法として選択肢のひとつとなりうる。

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 I, Mizuki N, Yazawa K, Ohno S Effects of astaxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo Invest Ophthalmol Vis Sci 44 2694-701, 2003
- 2 Zierhut M, Mizuki N, Ohno S, Inoko H, Gul A, Onoe K, Isogai M Immunology and functional genomics of Behcet's disease Cell Mol Life Sci 60 1903-22, 2003
- 3 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 60 396-9, 2002
- 4 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 1117-21, 2002

2、学会発表

- 1 Kitamura M, Takami K, Namba K, Kotake S, Ohno S Evaluation of revised diagnostic criteria 2001 for Vogt-Koyanagi-Harada's disease

International Work shop on Vogt-Koyanagi-Harada Syndrome, Rome, Italy 2003,5

- 2 Chairperson Ohno S Molecular genetic studies of intraocular inflammatory disease International Symposium on Ocular Inflammation, Padova, Italy, 2003,5
- 3 Chairperson Ohno S Free papers(3)-parallel session International Symposium on Ocular Inflammation, Padova, Italy, 2003,5
- 4 Namba K, Kitamei H, Yoshida K, Kotake S, Onoe K, Ohno S Suppression of experimental autoimmune uveoretinitis by pyrrolidine dithiocarbamate in mice International Symposium on Ocular Inflammation, Padova, Italy, 2003,5
- 5 Takahashi S, Namba K, Kotake S, Ohno S The evaluation of serum KL-6 in uveitis due to Sarcoidosis International Symposium on Ocular Inflammation, Padova, Italy, 2003,5
- 6 29 Okumura N, Namba K, Kotake S, Ohno S Two cases of acute posterior multifocal placoid pigment epitheliopathy International Symposium on Ocular Inflammation, Padova, Italy, 2003 5
- 7 Chairperson Ohno S Session 2 Immunogenetics and histopathology International Work shop on Vogt-Koyanagi-Harada Syndrome, Rome, Italy, 2003 5
- 8 人野重昭 ぶどう膜 2 第 107 回 日本眼科学会総会, 福岡, 2003, 4
- 9 西田朋美 戸田桃子, 石原麻美, 中村聡 水木信久 人野重昭 一般口演 患性腫瘍を合併したぶどう膜炎 第 107 回 日本眼科学会総会, 福岡, 2003, 4
- 10 北明大洲 南場研一, 小竹聡, 大神一浩, 白取謙治 大野重昭, 岩渕和也, 小野江和則, Ki-Wan Ha 一般口演 顆粒球吸着カラムによるヘーチェット病の治療 第 107 回 日本眼科学会総会, 福岡, 2003 4
- 11 Ohno S A case of endocyclitis associated with chronic active epstein-barr virus infection China-Japan Medical Conference 2002, Beijing, 2002, 11

H 知的財産権の出願 登録状況

特になし

実験的自己免疫性網膜ふとう膜炎後に誘導される制御性 T 細胞に関する研究

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 北市 伸義, 南場 研一、小野江 和則

研究要旨

これまでに我々は実験的自己免疫性網膜ふとう膜炎 (EAU) 回復後のマウス脾臓内に抗原特異的制御性 T 細胞が誘導されることを発見した。今回この細胞の誘導条件とその機能を検討した。

C57BL/6 (ワイルドタイプ) とメラノコルチン 5 受容体欠損 (MC5rKO) マウスを視細胞間レチノイト結合蛋白ペプチド (IRBPp) で免疫して EAU を誘導した。EAU 回復後の脾臓細胞を *in vitro* で抗原刺激し、活性化したのちに同系 EAU 感受性マウスに養子移入した。再誘導モデルでは EAU 回復後のマウスを再度免疫して EAU を誘導した。

EAU 後の脾臓から回収した CD4(+) T 細胞を養子移入すると EAU は軽症化した。再誘導モデルでは初回誘導時にはワイルドタイプと MC5rKO の EAU の経過に差はなかったか、再誘導時には MC5rKO マウスはワイルドタイプと異なりただちに発症し、重症化した。EAU 後のマウス脾臓内には MC5r に依存して制御性 T 細胞が誘導され、ふとう膜炎の再発抑制機構としてはたらく可能性がある。

A 研究目的

実験的自己免疫性網膜ふとう膜炎 (EAU) はヘーチェント病などヒト内因性ふとう膜炎のマウスモデルとされている。しかし、ヒトのふとう膜炎と異なりマウスモデルにおいては原則としてふとう膜炎が再発することはない。

最近免疫学領域では制御性 T 細胞の研究が急速に展開されており、自己免疫寛容を維持し、自己免疫疾患の発症を抑制する可能性が指摘されている。

本研究の目的は EAU から回復するメカニズムと制御性 T 細胞の誘導に関係があるか検討することである。以下に 4 つの実験結果を報告する。

B 研究方法

実験 1 「EAU 回復後の C57BL/6 マウス脾臓内に制御性 T 細胞が存在するか？」

C57BL/6 マウスを網膜抗原 IRBPp で免疫して EAU を惹起した。EAU から回復した免疫後 60 日目に脾臓を摘出して、抗原パルスした抗原提示細胞と共に 24 時間培養して制御性 T 細胞を活性化した。翌日培養細胞を回収し、CD4 陽性細胞を同系の EAU 感受性マウスに養子移入した。眼底は検眼鏡を用いて重症度を臨床的に評価した。

実験 2 「制御性 T 細胞の誘導は前房関連疫偏位 (ACAID) 機構によるものか？」

前房関連疫偏位 (ACAID) は 1970 年代に発

見された、眼に特有の免疫抑制機構である。一例を挙げると、カプランとストライラインの有名な実験に、同種異系皮膚移植を行う前にトナー組織の一部をレシピエントマウスの眼内（前房内）に注入しておく、その後の同種異系皮膚移植は拒絶されない、というものがある。今日 ACAID は眼の最も重要な免疫寛容機構の一つと考えられている。

ACAID 機構を活性化するには NKT 細胞が必要であることか既に報告されており、したがって NKT 細胞ノックアウトマウスではこの ACAID 機構は機能しない。そこで NKT 細胞ノックアウトマウスを免疫して EAU を惹起し、回復後の脾臓細胞を *in vitro* で培養した後に他の同系 EAU 感受性マウスに養子移入して EAU の重症度を観察した。

実験 3 「制御性 T 細胞の誘導にアルファメラノサイト刺激ホルモン (α -MSH) が関与しているか？」

眼前房水内には α -MSH が豊富に存在することか知られている。しかしながら α -MSH と皮膚色との関係は広く知られているものの、眼内での役割は全く不明である。メラノコルチン 5 受容体ノックアウト(MC5rKO) マウスの T 細胞には α -MSH を介した免疫制御能を獲得するための受容体が欠損している。したがって EAU から回復後の MC5rKO マウス脾臓細胞を *in vitro* で培養し、他の EAU 感受性マウスに養子移入した。

実験 4 「MC5r KO マウスで制御性 T 細胞が誘導されないとすれば、EAU を再度誘導した場

合の抵抗性も失われるか？」

MC5r KO マウスを IRBP で免疫して一度 EAU を惹起した。EAU から回復した後に同じマウスを再度免疫した。その際、完全フロイントアニュハントに含まれる結核菌に対する反応を避けるために、再免疫時は別の合成アシュハントである MPL+TDM でエマルジョンを作製した。

C 研究結果

結果 1 EAU 回復後のマウスより回収した CD4 陽性細胞移入群では、対照群である EAU を経験していないマウスから回収した群と比較して EAU は軽症であった。ふとう膜炎経験後のマウスから回収した脾臓細胞は EAU 抑制能を示した。

結果 2 ワイルトタイプから回収した T 細胞と NKT 細胞ノックアウトマウスから回収した T 細胞を養子移入した両群間で EAU の重症度に差はなかったか、コントロールである EAU 未経験マウス脾臓細胞注射群との間には有意差がみられた。

したがって、この EAU 回復後のふとう膜炎抑制能を持つ制御性 T 細胞の誘導に ACAID 機構は必須ではないと考えられた。

結果 3 MC5r KO マウスから回収した CD4(+) T 細胞を静注した群の EAU の推移は、ワイルトタイプマウスの脾臓細胞移入群と異なり、コントロール群であるナイーブマウスの脾臓細胞を静注した群と全く同じ経過であった。つまり、MC5r KO マウスから回収した CD4(+) T 細胞は EAU 回復後のワイルトタイプマウスでは

なく、ナイーブマウスの細胞と同じ振る舞いをするということである。

結果 4 実験 4 では両群とも 1 度目の EAU はほとんど同じ経過をたどった。しかし、EAU から完全に回復した後に再免疫した際の反応は全く異なった。MC5r KO マウスは再免疫後非常に重篤で長期間の EAU を起こし、EAU は免疫後たたちに発症した。これは MC5r KO マウス自身の 1 度目の EAU とも、ワイルドタイプマウスの 1 度目、2 度目の経過とも全く異なっていた。

すなわち、2 度目の EAU 誘導時にワイルドタイプマウスは再度一次免疫反応を示したのに対し、制御性 T 細胞を持たない MC5r KO マウスは二次免疫反応を示した、といえる。これは免疫学的に非常に大きな差である。

D 考察

制御性 T 細胞の誘導は自己免疫性ふとう膜炎の 2 度目以降の発作を抑制する上で重要である可能性がある。

発作を繰り返すヒトふとう膜炎ではこの制御性 T 細胞による免疫抑制機構の破綻が関与し

ている可能性が考えられる。

E 結論

ふとう膜炎回復後のマウス脾臓内には制御性 T 細胞が存在し、網膜自己抗原に対する既往性免疫反応を抑制した。

制御性 T 細胞は ACAID に代表される既知の機序ではなく、メラノコルチン 5 受容体の発現に依存する新たな免疫機序である。

制御性 T 細胞はヒトにおいて、ふとう膜炎の再発抑制に関与している可能性がある。

F 健康危険情報

なし。

G 研究発表

論文発表 なし。

学会発表 なし。

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（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

ヘーチェント病に関する研究

ヘーチェント病の新しい治療標的の探索

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生物分野
研究協力者 岩岡 和也 北海道大学遺伝子病制御研究所免疫生物分野
諸橋 人樹 北海道大学遺伝子病制御研究所免疫生物分野
北明 大州 同上 北大人学院医学科視覚器病学分野
南場 研一 北海道大学大学院医学研究科視覚器病学分野
人野 重昭 北海道大学大学院医学科視覚器病学分野

研究要旨 今年度は、新たな治療標的を探索する目的で、アロクラフト炎症因子 (AIF) -1 トランスジェニックマウス (Tgm) に Th1 病のモデルとして trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) 腸炎を誘導する系、およびヘーチェント病のモデル系である実験的自己免疫性フトウ膜炎 (EAU) を用いて NF- κ B の阻害剤 (pyrrolidine dithiocarbamate, PDTIC) の治療効果を解析した。TNBS 腸炎を AIF-1 Tgm で誘導すると、対照マウスと比較して Tgm において体重減少・死亡率が有意に低下した。この原因として、Tgm において大腸における IL-1 β 発現低下・IL-10 発現増加を伴う、Th2 へのシフトが考えられた。一方、EAU において PDTIC 治療群では、投与中における臨床スコア、あるいは感作 2 週目における病理組織スコアともに有意に抑制していた。以上より、AIF-1 や NF- κ B は治療標的として考慮され得る候補と考えられた。

A 研究目的

AIF-1 はアロ心移植ラットの慢性拒絶時にクラフト（移植片）で発現上昇する遺伝子としてクローニングされた¹⁾。AIF-1 はクラフトに侵潤する単核球に発現する。その後、移植時のみならず、実験的自己免疫性炎症モデル²⁻⁴⁾（フトウ膜炎 FAU、脳脊髄炎 EAE、神経炎 EAN）などにおいても、病変のクリア細胞を中心に発現亢進が判明している。単核系細胞における AIF-1 の機能を明らかにするために、マウスマクロファージ細胞株である RAW264.7 を親株として AIF-1 を過剰発現するトランスフェクタントを作製した。3 系統の細胞株をリポポリサッカライド (LPS) で刺激し、親株と比較したところ、IL-6, 10, 12p40 の産生が亢進していた⁵⁾。トランスフェクタントの解析から、AIF-1 の発現は炎症反応を修飾することから示唆されたため、*in vivo* における AIF-1 の発現亢進の効果を ヒト CD11b プロモーター

ターマウス AIF-1 の発現を駆動する Tgm を作製し、解析した。今回は EAU と同様に Th1 病と考えられる TNBS 腸炎モデルを AIF-1 Tgm で誘導した場合とどのような病態となるかを検討し、AIF-1 が炎症制御の標的となり得るか否かを検討した。

また、NF- κ B の活性化は様々な免疫担当細胞の活性化に関与していることが知られている⁶⁾。NF- κ B の構成サブユニットである p65 の発現を眼組織で見ると、正常では主にミューラー細胞の細胞質に存在し、その突起の局在に従って内網状層などに分布している。一方、EAU の発症時にはその発現パターンは消失し、内顆粒層に存在する核内に p65 の発現が認められた。このことは、FAU の誘導時に NF- κ B が活性化されて核内移行した結果と考えられた。すなわち、FAU の病変局所において NF- κ B が何らかの役割を果たしていることが推定された。このようなことから、NF- κ B 阻害薬である PDTIC がヘー

チェノト柄のモデルである FAU の制御に有用であるか否かについて検討した。

B 研究方法

1 AIF-1 Tgm の作製

トランスジェンはマウス AIF-1 cDNA の BamHI フラグメントをヒト CD11b プロモーターとヒト成長ホルモンポリアテニル化シグナルを含むヘクターに挿入し、作製した。同ヘクターを直線化し、その XhoI/Sac II フラグメントを (B6 x DBA/2)F1 の交配によって得られた受精卵 235 個にマイクロインジェクションし、3 系統の AIF-1 Tgm を確立した⁷⁾。本実験にはこのうち Line#39 を BALB/c に 4 代交代配したものをを用いた。

2 TNBS 腸炎発症実験

マウスは xylazine (50mg/kg)/ketamine (50mg/kg) にて麻酔後 対照の BALB/c には 1mg、AIF-1 Tgm には 1.5mg の TNBS を、対照には 50%エタノール浴液 (浴剤) をヒニルカテーテルを用いて肛側より 3.5cm の深さで肛腸した。マウスは毎日体重測定し、また健康状態、生存率、便性状などについて観察した。大腸は肛側より 2.5cm を採取し、病理組織作製 PCR のサンプルとした。病理学的検索は、凍結切片を hematoxylin/eosin (HE) で染色後、Ameho criteria に従ってスコア化した⁸⁾。

3 EAU の誘導実験

EAU は 6 週令の B10 BR ♀ にウシ視細胞間レチノイト結合蛋白質 K2 ペプチド (bIRBP₂₀₁₋₂₁₆ ADKDVVVI TSSRTGGV) 20 nmole をフロイントの完全アジュバントとともに側腹部皮下に免疫し、同日に百日咳毒素 0.1 μg を腹腔内投与することによって誘導した⁹⁾。翌日より、マウスを散瞳後、眼底を Bonnoscope と Superfield No. 1 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、眼球についてはクル

ータルアルテヒト前固定/フォルマリン後固定の後、パラフィン切片を HE 染色し、病理組織学的評価 (0-4) を行った。PDIc は感作当日より 100mg/kg にて PBS 浴液として、対照には PBS のみを 1 回/日で腹腔内投与した。

4 サイトカイン発現の解析

サンプルから抽出した RNA 5-10 μg から Moloney マウス白血病ウイルス逆転写酵素にて cDNA を作製し、このうちの 1/20 を PCR 反応の鋳型として用いた。TNBS 腸炎の実験では、cDNA を各種サイトカインのプライマー (IL-1β, 4, 10, 12p40, 13, TNF-1α, AIF-1, IFN-γ) で増幅し SYBR Green I で染色されたハントを HPRT (hypoxanthine phospho-ribosyl transferase) あるいは β-actin のハントを対照として NIH Image software を用いて比較した^{5,7)}。EAU の実験では、同様にして木梢リンパ組織及び眼組織から調整した cDNA を同様のプライマーをて増幅された産物を ABI Prism 7700 を用いて、リアルタイムにモニターした。

5 倫理面への配慮

動物実験は北海道動物実験委員会、遺伝子組換えを含む実験系については同組換え DNA 実験安全委員会での審議を経たのち、許可を得てから実施した。

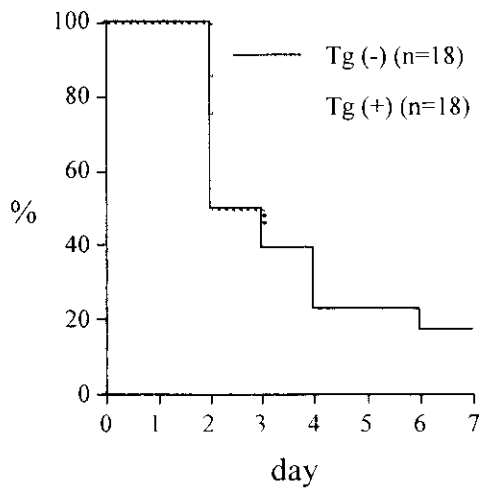
(C) 研究成果

1 TNBS 腸炎モデル

まず、正常 BALB/c マウスで TNBS 腸炎を誘導し、大腸における AIF-1、IFN-γ の発現を解析したところ、無処置 PBS 肛腸群と比較して TNBS 肛腸群の大腸病変部で AIF-1 の発現が上昇していた。このことから、TNBS 腸炎の発症 病態に AIF-1 発現は何らかの影響があるものと考えられた。そこで、CD11b プロモーターでマウス AIF-1 の発現を駆動するコンストラクトを導入し、樹立した Tgm (AIF-1 を単球マクロファージ系細胞で、恒常的に発現

している)でTNBS腸炎を誘導し、その経過 重症度などを解析した。その

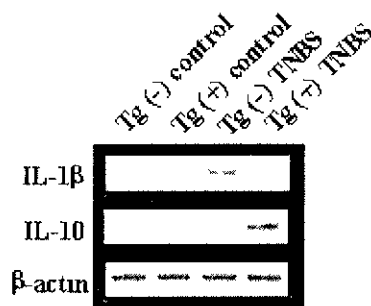
Survival rate



[図1 TNBS 併腸後の各群の生存率]

結果、Ig(+)で生存率は有意に高く また体重減少も抑制されていた(図1)。病理組織学的にも Tg(-)マウスではム 汎なネクロシスや出血を伴った粘膜 面の潰瘍が認められたか、Ig(+)では組 織破壊の程度はよりマイルドであった (組織学的スコア Tg(-)= 3.958±0.132 vs Tg(+)= 2.797±0.377, p<0.05)。

[図2 大腸病変部の遺伝子発現]



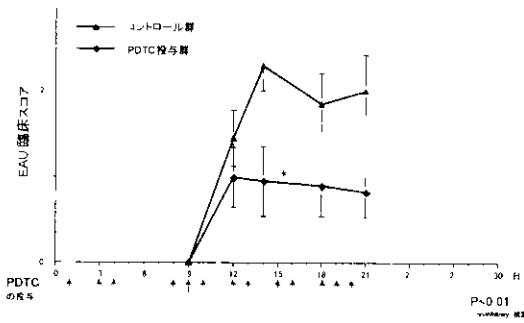
この軽症化のメカニズムを明らかにする 目的で、大腸病変部におけるサイトカイン 産生を解析した。その結果 病変部では IL-1βの発現が増強していたか、Tg(+) ではその上昇が抑制されていた。また

Tg(+)では対照組織で、既に IL-10 の発現 が認められ、病変部で特に発現増強が 認められた(図2)。TNF-αについては Tg(-)と Tg(+)の間で発現の差は認められ なかった。また IL-4についても同様に 差は認められなかったか、Tg(-)病変部では 発現が全く検出されなかったのに対して、 Tg(+)病変部では対照と同程度の発現 が検出された(データ示さず)。

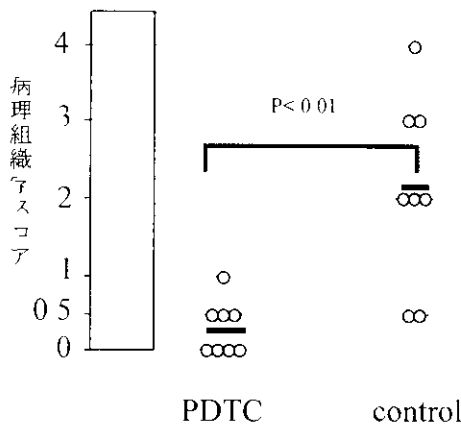
2 PDTCによるEAUの実験治療

NF-κB の阻害がEAUの発症 進展過程に 抑制的に作用するか否かを調べる目的で B10 BR マウスにウレシノロisin K2 ペプチドを 感作し、同時にPDTCを連日腹腔内投与した。その結果、EAUの臨床スコアは有意に 抑制された(図3)。また、病理組織学スコア ても、PDTCは抑制効果を示した (図4)。しかしながら、この抑制効果は 投与を中止することで、対照群との差は 無くなり、また発症後からの投与では効果 は認められなかった(データ示さず)。

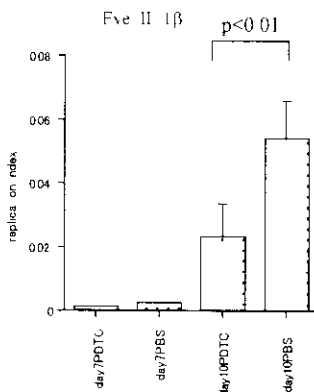
PDTCかどのように効果発現を示すかを 明らかにするために感作マウスのK2に対 するT細胞応答を解析した。PDTC投与マ ウスリンパ節から調整したT細胞は、対 照のPBS投与マウスから同様に調整した T細胞の増殖反応とほぼ同様の反応性を 示した。一方、PDTCをin vitroに添加した 場合には増殖反応は完全に阻害された (データ示さず)。以上のことから、PDTC によるEAUの抑制は、局所における眼炎 症の阻止によるものと考え、K2で感作後 7、10日の眼球からRNAを調整し、逆 転写、病変におけるサイトカイン産生を リアルタイムPCR法にて検証した。その 結果、感作後10日にてPDTC投与群では IL-1βの発現が有意に低下していた (p<0.05)。一方、局所リンパ節では、7、 10日とも両群で有意なサイトカイン発 現の変化は認められなかった(データ示 さず)。



[図3 PDTC投与によるEAUの経過]



[図4 EAUの病理組織学的スコア]



[図5 眼球におけるIL-1β発現]

D 考察

1 TNBS腸炎モデル

AIF-1トランスフェクタントを用いた研究から我々はAIF-1の過剰発現は単球系細胞のサイトカイン産生パターンを変化させ得ることを明らかにした¹³⁾。しかしながら、IL-10のみならず、同時にIL-6、IL-12p40の産生をも亢進させたため、in vivoにおける抗原誘発性自己免疫疾患モ

デルの疾患発症進展をとのよう修飾するか予側困難であった。今回、ヘーチェント柄のマウスモデルであるEAUと同様に、Th1病であるTNBS腸炎に対するAIF-1の単球系細胞での構成的発現増強の影響を解析したところ、腸炎の軽症化を認め、その効果は発症後の生存率の改善に反映された。作用機序としてIL-10発現増強、IL-4発現消失阻止などTh2へのシフトが推定された。AIF-1は最も原始的な多細胞生物である海綿からホモロク存在し、核酸アミノ酸配列も高度に保存されていることが知られている¹⁰⁾。Actin-cross-linking proteinとしての機能が推定されているか¹¹⁾、その細胞内における機能は未だ不明である。従って、AIF-1の構成的増強発現とサイトカイン産生パターンの修飾、またTNBS腸炎の軽症化との間にどのような関連があるのかを今後更に明らかにして行く必要がある。また、今回は腸炎モデルを解析したか、同様にEAUの系でAIF-1過剰発現の効果を検証することか包括である。

2 PDTCによるEAUの実験治療

PDTCはすでにNF-κB活性化を抑えることで敗血症性ショックの動物モデルの生存率を高めること¹²⁾ラットでエンドトキシン誘発性ぶどう膜炎(FIM)の発症進展を抑制すること¹³⁾、などが知られていた。今回我々はPDTCをウレBP K2ヘプチトを用いたEAUのマウスモデルで使用し、投与期間中はEAUの臨床、病理組織学的スコアの有意な抑制を示すことを示した。ぶどう膜炎が抑制されているマウスより得た脾細胞も、抗原特異的T細胞の増殖やサイトカイン産生は、体外では抑制されていなかった(PDTCを培養系に添加した場合には、増殖は完全に阻害された)。従って、in vivoでのぶどう膜炎の抑制には、眼球局所におけるNF-κBの活性化阻害による炎症性サイトカインの産生抑制が関与すると考えられた。今後の

課題として、より低毒性の NF- κ B の活性化阻害薬、あるいは NF- κ B decoy¹⁴⁾などの、局所的投与の開発が考えられた。

E 結論

Th1 病モデルである TNBS 腸炎の軽化に関連する AIF-1 や活性化阻害が GAU の発症進展過程を抑制することか出た。NF- κ B は治療標的として、新たに考慮されるべき候補と考えられた。

F 参考文献

- 1 Utans U et al J Clin Invest 1995, 95 2954-62
- 2 Schluesener HJ et al Glia 1998 24 244-51
- 3 Pashenkov M et al Scand J Immunol 2000 52 117-22
- 4 Kuschel R et al J Neuropathol Exp Neurol 2000, 59 323-32
- 5 Watano K et al Immunology 2001, 104 307-16
- 6 Barnes PJ and Karin M N Engl J Medicine 1997, 336 1066-71
- 7 Morohashi T et al Immunology 2003, 110 112-9
- 8 Ameho CK et al Gut 1997 41 487-93
- 9 Namba K et al Clin Exp Immunol 1998, 111 442-9
- 10 Kruse M et al J Cell Sci 1999, 112 4305-13
- 11 Sasaki Y et al Biochem Biophys Res Commun 2001, 286 292-7
- 12 Lauzurica P et al Eur J Immunol 1999, 29 1890-1900
- 13 Ohta K et al Invest Ophthalmol Vis Sci 43 744-50
- 14 Ogushi I et al Hepatology 2003, 38 335-44

G 研究発表

1 論文発表

- 1) Zierhut, M, Mizuki, N, Ohno, S, Inoko, H, Gul, A, Onoe, K and Isogai, E Immunology and functional genomics of Behçet's disease Cell Mol Life Sci 60 1903-22, 2003
- 2) Kikuchi, K, Yanagawa, Y, Aranami, I, Iwabuchi, C, Iwabuchi, K and Onoe, K Tumour necrosis factor- α but not lipopolysaccharide enhances preference of murine dendritic cells for Th2 differentiation Immunology, 108 42-9 2003
- 3) Onoe, K, Gotohda, I, 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 12 79-88, 2003

- 4) Shimada S, Iwabuchi, K, Watano, K, Shimizu, H, Yamada, H, Minakami, H and Onoe, K Expression of allograft inflammatory factor-1 in mouse uterus and poly (I C)-induced fetal resorption Am J Reprod Immunol 50 104-12, 2003
- 5) Shimada, S, Iwabuchi, K, Kato-Hirayama, E, Morikawa, M, Sakuragi, N, Onoe, 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 50 334-9, 2003
- 6) Yanagawa Y and Onoe, K CCR7 ligands induce rapid endocytosis in mature dendritic cells with concomitant up regulation of Cdc42 and Rac activities Blood, 101 4923-9 2003
- 7) Tosa, N, Murakami, M, Jia, W, Y, Yokoyama, M, Masunaga, T, Iwabuchi, C, Inobe, M, Iwabuchi, K, Miyazaki, T, Onoe, K and Uede, T Critical function of T cell death-associated gene 8 in glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis Int Immunol 15 741-9, 2003
- 8) Nakayama K, Hatakeyama, S, Maruyama S, Kikuchi, A, Onoe, K, Good, R A and Nakayama K Impaired degradation of I κ B and β -catenin as a result of targeted disruption of the β TrCP1 gene Proc Natl Acad Sci USA 100 8752-7, 2003
- 9) Kikuchi, K, Yanagawa, Y, Iwabuchi, K and Onoe, K Differential role of mitogen-activated protein kinases in CD40-mediated IL-12 production by immature and mature dendritic cells Immunol Lett 89 149-54, 2003
- 10) Morohashi T, Iwabuchi, K, Watano, K, Nyambayar, D, Mishima, T, Nakai, Y, Shimada S, Nishida, R, Fujii, S and Onoe, K Allograft inflammatory factor-1 (AIF-1) regulates trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis Immunology, 110 112-9, 2003
- 11) Pavlinkova, G, Yanagawa, Y, Kikuchi, K, Iwabuchi, K and Onoe, K Effects of histamine on functional maturation of dendritic cells Immunobiology, 207

- 315-25, 2003
- 12) Iijima N, Yanagawa, Y, Iwabuchi, K and Onoe K Selective regulation of CD40 expression in murine dendritic cells by thiol antioxidants *Immunology*, 110 197-203, 2003
- 13) Yamada, H, Shimada, S, Kato, E, Morikawa, M, Iwabuchi, K, Kishi, R, Onoe, K and Minakami, H Decrease in a specific killer cell immunoglobulin-like receptor on peripheral natural killer cells in women with recurrent miscarriage of unexplained etiology *Am J Reprod Immunol* 89 149-54, 2003
- 2 著書等
- 1) 小野江和則 CD3, CD16, CD2, CD25, CD23, CD8, CD4, CD45, 鋳型説, ウィン試験, 可溶性抗原抗体複合体, 感作細胞, 血清子, サイロクロフリン, 自己と非自己, 植物マイトネン, SCIDマウス, 側鎖説, 体細胞変異説, 同系の, ナイーフ細胞, 認識部位, ネットワーク説, 非自己, プファイファー現象, ポークウィートマイトネン, 四親性マウス, レパトア「医学大辞典」, 伊藤正男編, 医学書院, 東京 (2003)
- 2) Onoe, K, Kitaichi, N, Ohno, S, Iwabuchi, C and Iwabuchi, K 「NK and NK-T cells possibly involved in Behçet's Disease」, Eds by Zierhut, M and Ohno, S 'Immunology of Behçet's Disease' Swets & Zeitlinger, Lisse, The Netherlands (63-72, 2003)
- 3) 小野江和則, 岩例和也, 南場研一, 北明大州, 佐藤出, 小竹聡, 大野重昭 ヘーチェット病モデル動物を用いたフトウ膜炎発症 進展に対するケモカインの投与について 厚生労働科学研究(特定疾患対策研究事業)分担研究報告書 2003
- 4) 小野江和則 自己免疫疾患の成立機構 「New Mook 眼科, 眼の自己免疫疾患」大野重昭, 水尻忠彦, 吉田晃敏編, 全厚出版, 東京 1-10, 2003
- 5) 小野江和則 免疫寛容 「肝臓移植の実際」, 藤卓 省編, 日本医京 (印刷中)
- 6) 岩例和也, 小野江和則 第6項 脾臓 「モデル動物の作成と維持」, 森脇和郎, 山村研一, 木川博通編, エル アイノ一, 東京 (印刷中)
- 7) 小野江和則 翻訳 Really Essential Medical Immunology, by Ivan Roitt & Arthur Rabson, 西村書店 (印刷中)
- 8) 岩例和也 翻訳 Really Essential Medical Immunology, by Ivan Roitt & Arthur Rabson, 西村書店 (印刷中)
- 9) 北市伸義, 小竹 聡, 諸橋大樹, 小野江和則, 大野重昭, Andy Taylor NK細胞消去による実験的自己免疫性網膜ふとう膜炎の軽症化 日本眼科学会雑誌 (印刷中)
- 10) 菊地一博, 柳川芳毅, 岩例和也, 小野江和則 TNF- α によって修飾される樹状細胞の分化と機能, 臨床免疫, 40, 126-132, 2003
- 11) 柳川芳毅, 小野江和則 樹状細胞機能に対するケモカインの効果 臨床免疫 (印刷中)
- 3 学会報告
- 1) 岩例和也, Nyambayar Dashtsoodol, 岩例千雅子, 小野江和則 胸腺内NK細胞分化における上皮細胞の必要性 第22回日本胸腺研究会 2003 (於東京)
- 2) 北明大州, 南場研一, 小竹 聡, 大野重昭, 岩例和也, 小野江和則, 河本亮 顆粒球吸着カラムによるヘーチェット病の治療 第107回日本眼科学会総会 2003 (於東京)
- 3) 小野江和則, 岩例和也 CCL19によるマウス樹状細胞の形態変化とその免疫学的意義 第92回日本病理学会総会, 2003 (於福岡)
- 4) 岩例和也, 小野江和則 NK細胞は動脈硬化症に対して促進的に作用する 第92回日本病理学会総会, 2003 (於福岡)
- 5) 柳川芳毅, 小野江和則 CCR7リガンドは成熟樹状細胞による抗原取り込みを速やかに誘導する 第43回日本リンパ網内系学会, 2003 (於福岡)
- 6) Nakai Y, Iwabuchi W, Fujii S, Mishima I, Iwabuchi C, Dashtsoodol N, Nakamaya T, Taniguchi M, Miyake S, Yamamura T, Van Kaer L, Onoe K Natural killer 1 cells aggravate atherosclerosis in mice KTCC, 2003 (於京都)

- 7) Iclozan C, Aranami T, Iwabuchi K, Onoe K Bone marrow cells differentiate into medullary thymic epithelial cells but not cortical thymic epithelial cells 第36回北海道病理談話会 2003 (於 札幌)
- 8) 飯島則文、柳川芳毅、岩渕和也、小野江和則 樹状細胞におけるCD40発現の選択的制御 第36回北海道病理談話会 2003 (於 札幌)
- 9) 小野江和則 ノノポノウム T細胞免疫系の成立と生体内役割 第2回ノノポノウム「ハイオとナノを融合する新生命科学拠点」, 2003 (於 札幌)
- 10) 小野江和則 講演 T細胞免疫系の成立 札幌医科大学, 2003 (於 札幌)
- 11) D Nvambayar, K Iwabuchi, K Onoe Molecular analysis of CD1d in NKT deficient SI/Kh mice 第33回日本免疫学会総会学術集会, 2003 (於 福岡)
- 12) N Iijima, Y Yanagawa, K Onoe Role of early or late phase activation of p38 MARK induced by TNF- α or 2,4-dinitrochlorobenzene in maturation of murine dendritic cells 第33回日本免疫学会総会学術集会, 2003 (於 福岡)
- 13) 中井之人, 岩渕和也, 藤井 聡, 石森直樹, 綿野敬子, 三島鉄也, 中山俊憲, 谷口克 (Luc Van Kaer), ニモキ子, 山村 隆, 小野江和則 変成脂質付加によるマクロファージのCD1d発現増強 第33回日本免疫学会総会学術集会, 2003 (於 福岡)
- 14) 菊地一博, 柳川芳毅, 岩渕和也, 小野江和則 異なる成熟段階の樹状細胞によるIL-12産生に対するMAPキナーゼの役割 第33回日本免疫学会総会学術集会, 2003 (於 福岡)
- 15) 高木 大, 岩渕和也, 岩渕千雅子, 中丸祐爾, 大渡隆一郎, 福田 諭, Naoto Matsuki, Sebastian Joyce, 小野江和則 Wegener肉芽腫症および反復性多発性軟骨炎におけるV α 24/V β 11 NKT細胞の機能異常 第33回日本免疫学会総会学術集会, 2003 (於 福岡)
- 16) 柳川芳毅, 小野江和則 (CR7リカントは成熟樹状細胞のCdc42およびRacを速やかに活性化し抗原取り込み能を著しく増強する 第33回日本免疫学会総会学術集会, 2003 (於 福岡)
- 17) 岩渕和也, 岩渕千雅子, Nyambayar Dashtsoodol, 小野江和則 マイクロアレイを用いたNKT細胞特異的遺伝子発現の解析 第33回日本免疫学会総会学術集会, 2003 (於 福岡)
- 18) Iclozan C, Aranami I, Onoe K Analysis of the dividing T cell subsets and activation makers in syngeneic mixed lymphocyte reaction and homeostatic proliferation 第33回日本免疫学会総会学術集会, 2003 (於 福岡)
- 19) Yanagawa Y, Onoe K CCR7 ligands induce rapid endocytosis in mature dendritic cells with concomitant upregulation of Cdc42 and Rac activities 8th International Workshop on Langerhans Cells, 2003 (at Tokyo)
- 20) Yanagawa Y, Onoe K CCR7 ligands induce vigorous antigen-acquisition by mature dendritic cells 淡路島ノノポノウム, 感染と免疫 (於淡路島)
- 21) 小野江和則 講演 免疫部隊の兵隊と司令官 市民キャンパス「ハイオとナノか拓く北海道」 (於 札幌)
- 22) K Onoe T cell differentiation in allogeneic bone marrow chimeras Symposium 'Robert A Good Memorial Program on Tumor Immunology' 7th International Symposium on Molecular Basis of Predictive Oncology Intervention Strategies (at Nice)
- H 知的財産権の出願 登録状況 (予定を含む)
なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

ヘーチェット病に関する調査研究

分担報告研究

ヘーチェット病における heme oxygenase (HO)-1 の発現とその病態への関与

分担研究者	石ヶ坪良明	(横浜市立大学医学部 第一内科)
共同研究者	桐野洋平	(横浜市立大学医学部 第一内科)
	岳野光洋	(横浜市立大学医学部 第一内科)

我々はこれまでストレス誘導蛋白である heme oxygenase (HO) 1 の炎症制御作用につき基礎的な検討結果について報告。本年度、我々はヘーチェット病を含む様々な膠原病と健常者の末梢血単核細胞 (PBMC) および多核細胞における HO-1 の mRNA 発現を real time PCR 法、蛋白発現を ELSIA 法により定量的に解析し、臨床像との関連を検討した。健常者 PBMC はほとんど HO-1 を発現しておらず、*in vitro* hemin 刺激で主として単球にその発現が誘導されるか、血球貪食症候群や成人ステイロ病などのマクロファージ活性化症候群患者由来 PBMC は HO 1 mRNA を強く発現し、その程度は血清フェリチン値と正の相関を示した。一方、今回検討した活動期 1 例を含むヘーチェット病患者には HO 1 mRNA 発現増強例はなかった。また、real time PCR 法、ELSIA 法などの高感度検出系を用いることで、健常者由来好中球も hemin 刺激に反応して HO 1 を発現することを確認した。さらに、無治療の活動期ヘーチェット病患者の末梢血多核白血球は HO 1 mRNA および蛋白を強く発現していたか、PBMC ではほぼ健常者と同等であった。このような好中球における選択的な HO-1 の発現増強はヘーチェット病の病態形成に何らかの役割を果たしているものと考えられる。

A 研究目的

Heme Oxygenase (HO) はヘムを CO とヒリヘルソン、2 価鉄に分解する酵素で、二つの isozyme のうち 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。ヘム分解産物である CO は MAPK リン酸化による炎症制御、血管拡張作用、抗アポトーシス作用を、ヒリヘルソンはヒリルヒンに代謝され抗酸化作用を発揮する。さらに 2 価鉄は抗酸化作用を有するフェリチンを

誘導する。このように HO-1 はその代謝産物による“cytoprotection”と総称される機能を有し、呼吸器、循環器、神経系など様々な疾患の病態に関与していることが報告されている。我々の研究室からも肺の炎症性疾患や線維症マウスモデルに対する HO-1 遺伝子治療の有効性を報告している。

さらに、最近、IL-10 の抗炎症性作用機序に HO-1 の発現誘導が関与することも報告され、炎症の制御蛋白としても脚光を

浴ひ始めた。しかし、ヘーチェノト病 (B 病) や膠原病など全身性炎症疾患の病態形成における HO-1 の位置付けは不明である。以上の背景をもとに、我々は B 病を含む炎症性疾患患者の HO-1 発現を解析した。

B 研究方法

①対象 B 病患者および健康成人。

B 病患者 11 例 (男 5 例, 女 6 例, 平均年齢 48.7 才)、完全型 4 例、不全型 7 例、神経型 3 例、血管型 1 例、腸管型 1 例。その他の膠原病炎症性疾患患者および健康者。

(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、文書にて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二重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。多核白血球中の好中球の比率は 95% 以上であった。

③細胞培養 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、6 時間 (mRNA 定量) ないしは 24 時間 (ELISA 法による蛋白定量) 培養して回収した。

④real-time PCR 法 Trizol を用いて細胞から RNA を抽出し、cDNA を合成した。HO-1、GAPDH、CD14 の mRNA 量をそれぞれに特異的な primer と probe を用い ABI 7700 sequence detection system (Perkin Elmer) により解析した。HO-1 の発現量は GAPDH および単球マーカーの CD14 により補正し、算出した。

⑦ ELISA 法 細胞を 1% Triton-X を含む溶解液で溶解して蛋白を抽出し、ヒト HO-1 検出 ELSIA キットを用いて、HO-1 蛋白量を定量した。

C 研究結果

①健康者より回収した分離直後の PBMC はほとんど HO-1 mRNA、蛋白を発現していないが、*in vitro* で hemin 刺激することにより HO-1 の mRNA および蛋白が強く誘導される (図 1)。PBMC を抗 CD3、CD14、CD20 モノクローナル抗体を用いて MACS 法により分画すると、HO-1 発現のほとんどは CD14 陽性細胞によるものであった。したがって、PBMC における自発的な HO-1 の発現量は単球の比率に影響をうける可能性があるため、今回の real time PCR 法による PBMC 中の HO-1 mRNA の解析にさいして、house keeping gene である GAPDH のほか、単球系マーカーである CD14 mRNA 量により補正した。

②PBMC の HO-1 mRNA 発現について B 病を含む多様な膠原病患者を対象に real time PCR 法により半定量的に解析した結果、マクロファーン活性化症候群 (MAS) と呼ばれる血球貪食症候群や、成人スチール病の患者では HO-1 発現が高値であり、臨床検査データの中では血清フェリチンと正の相関を示し、CRP、ESR、WBC、LDH などの炎症パラメーターとは相関しなかった。今回検討した活動期 1 例を含む B 病患者の PBMC における HO-1 発現は健康者との有意差を認めなかった (図 2)。

③B 病では好中球機能過剰が病態形成に

重要な要因となっている。そこで今回、好中球における HO-1 の発現を解析した。これまで、好中球における HO-1 の発現を conventional な RT-PCR 法、ウェスタン法、免疫細胞化学法などで検討してきたが、ほとんど検出されなかった。本年度確立した real time PCR 法および ELISA 法など高感度の手法を用いると、hemin 刺激好中球において HO-1 mRNA レベルでも蛋白レベルでも誘導されることか確認された。但し、量的には単球 マクロファーン系の 1/10 以下程度であった。

さらに、B 病患者好中球中の HO-1 を解析したところ、活動性患者好中球では健康人や非活動性患者と比へ、HO-1 mRNA および蛋白量が高かった (図 3、4)。

D 考察

今回の B 病患者の検討は活動性患者かわすか 1 例で、preliminary な成績にとどまるか、この 1 例の患者において PBMC (単球) に HO-1 発現増強か検出されないにもかかわらず、好中球のみに選択的に HO-1 の発現亢進か検出されたことは、B 病病態形成における好中球の役割を鑑みたとき、極めて興味深い結果といえる。

これまでにもマクロファーン系細胞における HO-1 の発現誘導により IL-8 産生か抑制され 二次的に好中球炎症か制御されることか報告されてきたか、好中球自身の HO-1 発現制御についての知見は少ない。好中球に誘導された HO-1 による heme 代謝産物か活性酸素産生をはしめとした好中球機能にとう影響するかも興味深い点である。

B 病の病態における HO-1 役割を検討していく上では、症例を蓄積し、疾患活動性や病型との関連、治療薬の影響などを明らかにし、さらには病変局所に侵潤した好中球における HO-1 発現について検討する必要かある。これらの検討を通して過剰に発現している HO-1 の意味づけ、病態における役割を解明していきたい。

E 結論

B 病活動性患者で観察された好中球における選択的な HO-1 発現増強につき今後検討していく価値かあるものと思われる。

図1 好中球のHO-1誘導

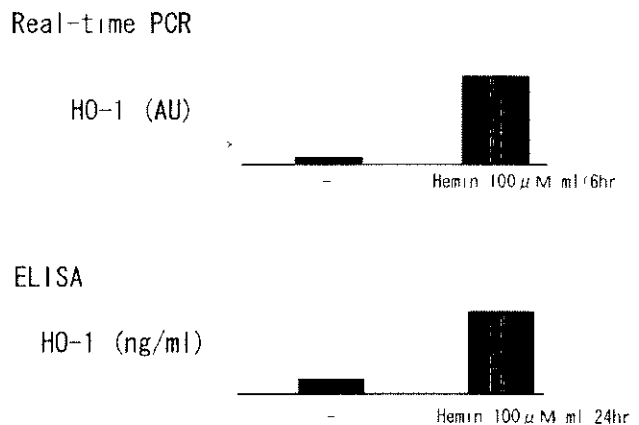


図2 ヘーチェット病患者PBMCのHO-1 (mRNA) 発現

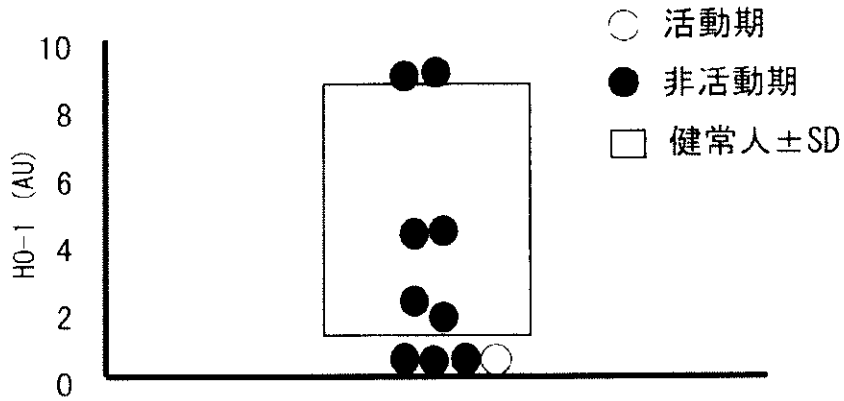


図3 ヘーチェット病患者好中球のHO-1発現

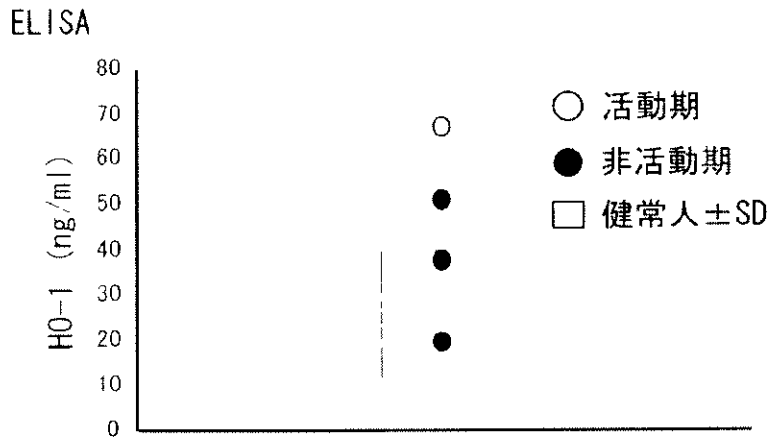
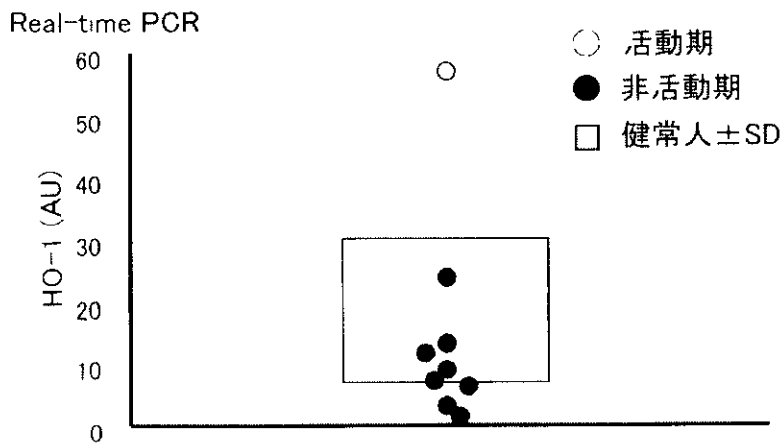


図4 ヘーチェット病患者好中球のHO-1(mRNA)発現



厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
ヘーチェット病に関する調査研究
分担研究報告書

Alpha-melanocyte stimulating hormone の抗炎症効果に関する研究

分担研究者 大野 重昭 北海道大学大学院医学研究科教授

研究要旨

LPS 誘発ふとう膜炎モデルに対す alpha-melanocyte-stimulating hormone (alpha-MSH)の抗炎症作用を調べた。さらにマクロファーン培養細胞を用いて誘導型シクロオキシゲナーゼ(COX-2)の発現に対する作用を調べた。ラットにLPSを200 µg/kg投与し、ふとう膜炎を惹起した。LPS投与24時間後房水を採取し、細胞数、蛋白量、各種炎症性サイトカインを定量した。Alpha-MSHはLPS投与直後に静脈内投与した。COX-2に対する作用の検討では、培養したマクロファーンの培地中にLPSおよびalpha-MSHを加え、24時間後細胞を回収し各群のCOX-2蛋白をイムノブロット法により検出した。LPS投与群の房水中細胞数、蛋白量、各種炎症性サイトカイン濃度は正常ラット房水と比べて有意な高値を示した。これに対しAlpha-MSH投与群では投与量依存的に低値を示した。LPS処理によるCOX-2誘導に対してもalpha-MSHは濃度依存的に抑制効果を示した。以上の成績からalpha-MSHの抗炎症メカニズムのひとつとしてCOX-2誘導抑制作用が考えられた。

A 研究目的

Alpha-melanocyte-stimulating hormone(alpha-MSH)は前房内に存在する免疫抑制物質の一つとして知られており、種々の炎症モデルに対して作用を示す事が知られている。今回エントキソノ誘発ふとう膜炎に対する作用を調べた。さらにマクロファーン培養細胞を用いて誘導型シクロオキシゲナーゼ(COX-2)の発現に対する作用を調べた。

B 研究方法

ルイス系ラットにリポポリサッカライド(LPS)を200 µg/kg投与し、ふとう膜炎を惹起した。LPS投与24時間後房水を採取し、細胞数、蛋白、

prostaglandin F₂ (PGE₂)、tumor necrosis factor-alpha (INF-alpha)、interleukin-6 (IL-6)およびmonocyte chemoattractant protein(MCP-1)を定量した。Alpha-MSHはLPS投与直後に10、100および1000 g/kg静脈内投与した。COX-2に対する作用の検討では、マウスマクロファーン(RAW264.7)の培地中にLPSを10 µMおよびalpha-MSHを各濃度加え、24時間後細胞を回収し各群のCOX-2タンパクをイムノブロット法により検出した。

(倫理面への配慮)

使用する動物数は最小限にとどめ、動物に与える苦痛に対して十分注意し、実験操作においては予め北海道大学大学院医学研究科動