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

ベーチェット病の病態形成における Th1 細胞の関与に関する研究

分担研究者　鈴木　登　聖マリアンナ医科大学免疫学・病害動物学教授

研究要旨
腸管ベーチェット病では病変部で Th1 型サイトカインの発現亢進を認め、Txk、CCR5 を発現する Th1 細胞と、MIP-1 を発現するマクロファージの浸潤を認めた。病変部では、TLR2 と HSP60 の発現亢進を認め、これらを介した免疫系の活性化が関与する Th1 優位な免疫現象がベーチェット病の病態に関わることが明らかとなった。同様に神経ベーチェット病の脳脊髄液中に、病勢と一致して炎症性サイトカインの産生を認め、病変部に一致した炎症病態の存在が確認された。

A. 研究目的

既にベーチェット病における Th1 優位な免疫反応すなわち Th1/Th2 バランスの偏重を明らかにし、その是正が新しい治療戦略となりうる可能性を報告した。腸管ベーチェット病における Th1/Th2 バランスと、病態発現機序およびそれらに関わる分子レベルでの解析により、新たな治療戦略と標的分子を明らかにする。

B. 研究方法

腸管ベーチェット病の手術、生検標本および対照としてクローン病の生検標本より RT-PCR 法、免疫組織化学を用いることでサイトカイン、ケモカインとその受容体、Txk、HSP60、TLRs の発現と病変部浸潤細胞の同定を行なった。また、神経ベーチェット病と対照としての ALS の脳脊髄液中の炎症性サイトカイン濃度を ELISA にて測定し、病態への関与を検討した。なおいずれの検体取得にも十分な説明と同意の上、倫理上の配慮を行なった。

C. 研究結果

腸管ベーチェット病の病変部には CD4+かつ Txk+、CCR5+の Th1 細胞の優位な浸潤を認めた。これらの周囲にはマクロファージの浸潤も認め、HSP60、TLR2 の発現亢進を認め、これらによるマクロファージ活性化が示唆された。また MIP-1α、MIP-1βの発現を認め Th1 誘導性ケモカインの発現が Th1 細胞の浸潤をきたしたと考えられる。また、神経ベーチェット病の活動期に一致して、脳脊髄液中の IL-6、TNF-αの濃度が上昇しており、これら炎症性サイトカインの神経病態への関わりが示された。しかし、抗 HSP 抗体は対照と著変なく認められ病勢とも関係なく検出された。これは血清中で脳脊髄液より高濃度で測定され、病態への関与は明らかでない。

D. 考察

腸管ベーチェット病における HSP60 の発現亢進は感染症を含めたストレスの存在を示唆するが、最近の報告では HSP60 は TLR のリガンドのひとつであり、両者の発現亢進は自然免疫機構を介しマクロファージの活性化を誘導し、さらにこれに続く特異的免疫応答を活性化させる可能性があり、腸管ベーチェット病の Th1 細胞浸潤と活性化をもたらす機序のひとつとして重要であると考えられた。TxK、CCR5/MIP-1 の制御による Th1 型免疫反応の抑制に加え、TLR2 の発現およびシグナル伝達の制御は腸管ベーチェット病の新しい治療戦略として有用であると思われる。また神経ベーチェット病での抗 HSP60 抗体の血中濃度は対照とほぼ同程度に上昇しており、抗 HSP60 抗体は病態の悪化よりむしろ HSP60 の排除（中和）に関与している可能性が示唆された。TNF-αをはじめ炎症性サイトカインの関与はベーチェット病の病態に共通して認められる事から、抗 TNF-α抗体による治療の有効性が期待される。

E. 結論

ベーチェット病では HSP60 の発現亢進が TLR を介し過剰な免疫反応を惹起する可能性があり、Th1 優位な免疫反応と炎症性サイトカインの制御による治療とともに新たな分子標的として重要であると思われる。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 鈴木登、金子栄: 1.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, pp.14-23,2004
2) Kurokawa SM, Suzuki N: Behcet's Disease. Clin Exp Med 3, 10-20, 2004
3) Nagaya M, Kubota K, Suzuki N, Tadokoro M, Akashi K : Evaluation of thermoreversible gelation polymer(TGP) for regeneration of focal liver injury. European Surgical Research 36(2),95-103, 2004
4) Chiba S, Ikeda R, Kurokawa SM, Yosikawa H, Takeno M, Nagafuchi H, Tadokoro M, Sekino H, Hashimoto T, Suzuki N: Anatomical and functional recovery by embryonic stem (ES) cell-derived neural tissue of a mouse model of brain damage. J Neurological Science 129, 107-117, 2004
5) Nagafuchi H, Yoshikawa H, Takeba Y, Nara K, Miura K, Kurokawa SM, Suzuki N: Recombination activating genes (RAG) induce secondary Ig gene rearrangement in and subsequent apoptosis of human peripheral blood circulating B lymphocytes. Clin Exp Immunol 136(1), 76-84, 2004
6) Kurokawa SM, Yoshikawa H, Suzuki N: Behcet's Disease. Semonars in Respiratory and Critical Care Medicine 25(5), 557-568, 2004
7) Takeno M, Yoshikawa H, Kurokawa SM, Kashiwakura J, Sakaguchi M, Yasuda H, Suzuki N:Th1-dominant shift of T cell cytokine production, and subsequent reduction of serum Immunoglobulin E response by administration in vivo of plasmid expressing Txk/Rlk, member Tec family tyrosine kinase. Clin Exp Allergy 34(6), 965-70, 2004
8) Ikeda R, Kurokawa SM, Chiba S, Yoshikawa H, Hashimoto T , Tadokoro M,Suzuki N: Transplatation of mononeurons derived from MASH1 transfected mouse ES cells reconstitutes neural networks and improves motor function in hemiplegic mice.Exp Neurol 180(2),280-292, 2004.
9) Homma R, Yoshikawa H, Takeno M, Kurokawa MS, Masuda C, Takda E, Tsubota K, Ueno S, Suzuki N: Induction of epithelial progenitor in vitro from mouse embryonic stem (ES) cells and the application for reconstruction of damaged cornea in mice. Invesigative Ophthalmology & Visual Science 45, 4320-4326, 2004
10) Hamada M, Yoshikawa H, Kurokawa SM,

Chiaba S, Masuda C, Takda E, Watanabe K, Sakakibara M, Akashi K, Aoki H, Suzuki N: Transplantation of neural progenitors derived from embryonic stem cells bring about functional and electrophysiological recoveries of mice with spinal cord injury. Inflammation and Regeneration, in press, 2004.

11) Chiba s, Kurokawa SM, Yoshikawa H, Ikeda R, Takda E, Masuda C, Takeno M, Tadokoro M, Sekino H, Hashimoto T, Suzuki N: Noggin and basic FGF were implicated in forebrain fate and caudal fate, respectively, of the neural tube-like structures emerging in mouse ES cell culture. Experimental Brain Research, in press, 2004

12) Yoshikawa H, Nara K, Suzuki N: Neuro-endocrine-immune interactions in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Recent Research Developments in Immunology. Research Signpost. Kerala, India. in press, 2004

13) Nagafuchi H, Takeno M, Yoshikawa H, Kurokawa SM, Nara K, Takda E, Masuda C, Mizoguchi M, Suzuki N: Excessive expression of Txk, a member of Tec family tyrosine kinases, contributes to excessive Th1 cytokine production by HSP reactive T lymphocytes in patients with Behcet's disease. Clin Exp Immunol , in press, 2004

14) Ikeda R, Kurokawa SM, Chiba S, Yoshikawa H, Ide M, Takda E, Masuda C, Tadokoro M, Nito S, Nakatsuji N, Kondoh Y, Nagata K, Hashimoto T, Suzuki N: Transplatation of neural cells derived from retinoic acid-treated cynomolgus monkey embryonic stem cells successfully improved motor function of hemiplegic mice with experimental brain injury. Neurobiology of Disease, revising, 2004

15) Imamura Y, Kurokawa SM, Yoshikawa H, Nara K, Tsukikawa S, Ozaki S, Masuda C, Sizuki N:Involvement of Th1 cell and heat shock protein 60 in pathogenesis of intestinal Behcet's Disease. Clin Exp Immunol, in press, 2004.

16) Sakane T, Suzuki N: Neuro–endocrine–immune axis in human rheumatoid arthritis. Autoimmunity Kluwer Academic Publishers, Wroclaw, Poland, in press, 2004

2. 学会発表

1) 鈴木登：ベーチェット病の抗サイトカイン療法　シンポジウム 3「免疫性神経疾患の新しい治療法」第 16 回日本神経免疫学会学術集会、2004. 1. 31.

2) 武永美津子、都倉亨恵、松本香代、北川晶、山口葉子、水島裕、鈴木登、岡野栄之、川合眞一、五十嵐理慧：神経幹細胞による外傷性脊髄損傷後の運動機能回復ーレシチン化タンパク製剤の有用性ー第 3 回日本再生医療学会、2004. 3.

3) 池田律子、黒川真奈絵、吉川英志、千葉俊明、仁藤新治、中辻憲夫、橋本卓雄、鈴木登:カニクイザル ES 細胞の神経幹細胞への分化誘導および大脳損傷モデルへの移植による運動機能改善、第 3 回日本再生医療学会、2004. 3.

4) 長屋昌樹、窪田倭、鈴木登、田所衛、明石勝也：肝小欠損部に温度感応性ハイドロゲルを用いた組織再生時の Kupper 細胞と星細胞の役割、第 3 回日本再生医療学会、2004. 3.

5) 蒲池宏明、黒川真奈絵、吉川英志、青木治人、鈴木登：マウス胚性幹(embryonic stem:ES)細胞からの筋組織の分化誘導、第 3 回日本再生医療学会、2004. 3.

6) 池田律子、千葉俊明、岳野光洋、黒川真奈絵、濱田真里、吉川英志、橋本卓雄、近藤靖、長田乾、鈴木登：胚性幹(ES)細胞由来神経前駆細胞の大脳移植治療、第 27 回日本神経外傷学会、2004. 3.

7) 千葉俊明、濱田真里、鈴木登、渡辺憲史、榊原学、田口芳雄：離断型脊髄損傷への移植治療ー胚性幹細胞移植による機能改善の検討、第 27 回日本神経外傷学会、2004. 3.

8) 濱田真里、吉川英志、黒川真奈絵、千葉俊明、渡辺憲史、榊原学、明石勝也、青木治人、鈴木登：完全離断型脊髄損傷におけるマウス胚性幹(ES)細胞由来神経細胞の生着と機能改善、第 25 回日本炎症・再生医学会、2004. 7.

9) 黒川真奈絵、今村愉子、吉川英志、松田隆秀、鈴木登：ベーチェット病の病態におけるHSP60 とT細胞/サイトカインの関与、第 48 回日本リウマチ学会、2004. 4.

10) 陳志云、吉川英志、黒川真奈絵、鈴木登：

Inhibition of Fas/FasL interation reduces the endothelial cell apotosis induced by ischemia/reperfusion in glomerulus. 第25回日本炎症・再生医学会、2004.7.

11) 黒川真奈絵、池田律子、吉川英志、千葉俊明、仁藤新治、中辻憲夫、橋本卓雄、鈴木登:霊長類ES細胞由来神経幹細胞による移植治療、第25回日本炎症・再生医学会、2004.7.
12) 蒲池宏明、黒川真奈絵、吉川英志、青木治人、鈴木登：マウス胚性幹(embryonic stem)細胞からの筋組織の分化誘導、第25回日本炎症・再生医学会、2004.7.
13) 鈴木登：胚性幹細胞を用いた再生医学研究、聖マリアンナ医科大学医学会第 47 回学術集会　シンポジウム「再生医療」、2004.7.
14) Nonaka N, Ikejima H, Shiraishi M, Hayashi J, Enomoto M, Kurokawa SM, Kamo T, Matsuda T, Suzuki N:Level of TNF-alpha and HSP-60 in cerebrospinal Fluids obtained from neuro-Behcet's Disease patients. 7th International congress of neuroimmunology, 2004.9.
15) 櫻井謙、田嶼朝子、飯塚佐代子、鈴木登、大橋十也、衛藤義勝:マウス胚性幹細胞を用いたライソゾーム病の細胞治療法の開発、第 47 回日本先天代謝異常学会、2004.11.
16) Kurokawa SM, Imamura Y, Nara K, Yoshikawa H, Matsuda T, Suzuki N. Th1 dominant immune response and excessive expression of heat sock protein 60 are associated with the inflammation of intestinal Behcet's, disease. 第34回日本免疫学会総会, 2004.12.3.

H. 知的所得権の取得状況

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

ベーチェット病患者末梢血における細胞傷害性T細胞の活性化の経時的解析

分担研究者　桑名正隆　慶應義塾大学医学部先端医科学研究所講師
研究協力者　安岡秀剛　慶應義塾大学医学部内科助手
水木信久　横浜市立大学医学部眼科教授
西田朋美　横浜市立大学医学部眼科助手

研究要旨
ベーチェット病の病態に $CD4^{+}$T 細胞の関与が知られているが，病変部組織に高頻度に浸潤する $CD8^{+}$T 細胞や$\gamma\delta$ T 細胞など細胞傷害活性を有する T 細胞の役割は明らかでない。我々は昨年度の本研究班で，活動期ベーチェット病患者末梢血中で $CD8^{+}$および$\gamma\delta$T 細胞の活性化がみられ，特に $V\delta1^{+}$T 細胞にその傾向が顕著なことを報告した。この知見をさらに確認するため，末梢血中のこれら T 細胞の活性化状態をベーチェット病患者 5 例の活動期と非活動期で経時的に比較した。全例で活動期に増加していた活性化マーカーCD69 陽性の $CD8^{+}$，$\gamma\delta$T 細胞の比率が治療後の非活動期に減少した。また，CD69 陽性の活性化 $V\delta1/V\delta2$ 比も活動性の低下に伴って減少した。したがって，$CD8^{+}$ T 細胞 および$\gamma\delta$T 細胞はベーチェット病活動期に活性化され，病態形成に関与すると考えられた。

A. 研究目的

ベーチェット病は口腔潰瘍，外陰部潰瘍，眼・皮膚症状を主徴とした全身性炎症性疾患だが，その病態はいまだ明らかでない。ベーチェット病患者病変部組織では好中球のほかに $CD4^{+}$T 細胞，$CD8^{+}$T 細胞，$\gamma\delta$T 細胞など多彩な炎症性細胞の浸潤を認める。これまでベーチェット病では $CD4^{+}$T 細胞に注目した研究が中心に行われ，その病態における重要性が示されてきた。しかし，$CD8^{+}$T 細胞や$\gamma\delta$T 細胞など細胞傷害活性を持つリンパ球に関する知見はほとんどなかった。我々は昨年度の本研究班で，活動期および非活動期ベーチェット病患者におけるこれら細胞傷害活性を持つ T 細胞の活性化状態を検討した。その結果，活動期ベーチェット病では非活動期ベーチェット病および健常人と比べて，$CD8^{+}$T 細胞，$\gamma\delta$T 細胞の活性化レベルが高く，特に $V\delta1^{+}$T 細胞の活性化が顕著なことを見出した。そこで，これら知見を確認するために末梢血中の T 細胞の活性化状態を同一のベーチェット病患者の活動期と非活動期で経時的に比較検討した。

B. 研究方法

1. 対象

対象は厚生労働省研究班の診断基準を満たすベーチェット病5例で（平均年齢53.8±6.9歳），いずれの症例も新たな治療を要する活動性眼病変（眼発作）を有していた。男女

比は2:3で，5例中4例は完全型，2例がHLA-B51陽性であった。治療開始前の活動期および治療により症状が軽快した非活動期の2回に渡って採血した。

2. 細胞表面マーカーの解析

比重遠心法により分離した末梢血単核球をCD3，CD4，CD8，CD69，pan-γδT細胞受容体，Vδ1$^+$T細胞受容体，Vδ2$^+$T細胞受容体に対するモノクローナル抗体を用いて多重染色し，フローサイトメトリーにより解析した。

3. 統計学的解析

活動期と非活動期におけるデータの変化はWilcoxon testを用いて検定した。

（倫理面への配慮）

すべての患者検体は学内の倫理委員会で承認された文書によるインフォームドコンセントを得た上で提供を受けた。

C. 研究結果

CD3$^+$T細胞に占めるCD8$^+$，γδ，CD4$^+$T細胞の比率を活動期と非活動期で比較した（図1上)。CD8$^+$T細胞比率の変化に一定の傾向はなかったが，γδT細胞比率は非活動期に低下した。検討しえた症例数は少なかったものの，CD4$^+$T細胞比率は非活動期に増加する傾向があった。CD3$^+$T細胞中の活性化マーカーCD69を発現する細胞の比率を経時的に比べると，CD8$^+$CD69$^+$，γδ$^+$CD69$^+$，CD3$^+$CD69$^+$T細胞の比率はいずれも非活動期に低下した（図1下)。一方，CD4$^+$CD69$^+$T細胞比率に変化はみられなかった。CD4$^+$，CD8$^+$，γδT細胞それぞれのサブセット中のCD69$^+$活性化T細胞の比率も同様の変化を示した（図2上)。Vδ1$^+$およびVδ2$^+$γδT細胞中におけるCD69$^+$活性化T細胞の比率はいずれも非活動期に低下した（図2下)。Vδ1$^+$/Vδ2$^+$γδT細胞比の変化に一定の傾向はなかったが，解析対象をCD69$^+$活性化T細胞に限定するとVδ1$^+$/Vδ2$^+$比は活動性の消失と共に低下した。なお，いずれの検討においても，性，病型，HLA-B51の有無による差を認めなかった。

D. 考察

昨年度の検討では，ベーチェット病の活動期にCD69$^+$の活性化CD8$^+$，γδT細胞の比率が増加し，特にVδ1$^+$γδT細胞の活性化状態が高いことが明らかとなった。今回，同一症例での経時的な検討を行い，活動期にみられたCD8$^+$，γδT細胞の活性化状態が治療による臨床症状の消失に伴って低下することが確認された。したがって，細胞傷害活性を有するCD8$^+$，γδT細胞が細胞傷害を介してベーチェット病に特有な病変形成に関与する可能性が示唆された。

我々の検討ではベーチェット病患者末梢血中で，疾患活動性の有無にかかわらずCD4$^+$T細胞の活性化フェノタイプの増加がみられなかった。この点はTh1反応を介してCD4$^+$T細胞がベーチェット病の病態と深く関わることを示した従来の報告と矛盾する。この点に関して，CD4$^+$T細胞は抗原特異的な活性化シグナルにより高率に活性化誘導性細胞死（activation-induced cell death; AICD)に陥ることが知られている。そのため，活性化状態の高いCD4$^+$T細胞が細胞死することにより末梢血中で増加しない可能性がある。また，活性化マーカーとして用いたCD69がCD4$^+$T細胞における活性化状態を評価する指標として適していない可能性もある。

CD8$^+$，γδT細胞，特にVδ1$^+$T細胞，の活性化を一元的に説明しうる分子としてMICAが挙げられる。MICAはVδ1$^+$T細胞受容体のリガンドで，MICA発現細胞はVδ1$^+$T細胞の活性

化を直接的に誘導する。一方，MICA は細胞傷害活性を持つ CD8$^+$T 細胞，γδT 細胞，NK 細胞の多くに共通して発現する NKG2D のリガンドでもあり，これらリンパ球における細胞傷害活性を増強する。MICA の発現は上皮細胞，血管内皮細胞，表皮細胞などに限局し，熱などのストレスによって誘導されることが知られている。したがって，MICA は外界と接する皮膚や粘膜でストレスにより発現誘導され，環境要因により傷ついた細胞がγδ細胞をはじめとした細胞傷害活性を有するリンパ球により認識される際の目印となる分子と考えられている。ベーチェット病患者における臨床症状の悪化が細菌感染や機械的な刺激により誘導されることから，感染や物理的な刺激などのストレスによる上皮細胞や血管内皮細胞における MICA の発現が NKG2D 結合を介して細胞傷害性 T 細胞の活性化を誘導し，さらに T 細胞受容体による認識により Vδ1$^+$γδT 細胞のさらなる活性化を促す。これら組織内における MICA を介した細胞傷害活性がベーチェット病に特徴的な病変形成に関与する可能性がある。この仮説については今後のさらなる検証が必要だが，ベーチェット病の病因・病態を解明する上で重要な知見と考えられる。

E. 結論

ベーチェット病活動期には CD8$^+$，γδT 細胞の活性化がみられ，これら細胞傷害活性を有する T 細胞が組織傷害などを介してベーチェット病の病態に関与する可能性が示された。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kuwana M. β_2-glycoprotein I: antiphospholipid syndrome and T-cell reactivity. *Thromb. Res.* 2004;114:347-55.
2) Yasuoka H, Okazaki Y, Kawakami Y, Hirakata M, Inoko H, Ikeda Y, Kuwana M. Autoreactive CD8$^+$ cytotoxic T lymphocytes to major histocompatibility complex class I chain-related gene A in patients with Behcet's disease. *Arthritis Rheum.* 2004;50:3658-62.
3) Kuwana M, Matsuura E, Kobayashi K, Okazaki Y, Kaburaki K, Ikeda Y, Kawakami Y. Binding of β_2-glycoprotein I to anionic phospholipids facilitates processing and presentation of a cryptic epitope that activates pathogenic autoreactive T cells. *Blood.* In press.

2. 学会発表

Yasuoka H, Mizuki N, Nishida T, Hirakata M, Kawakami Y, Ikeda Y, Kuwana M: *In vivo* activation of CD8$^+$ T cells and γδ T cells in Behcet's disease. The 68th Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology (San Antonio). 2004. 10.

H. 知的所得権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

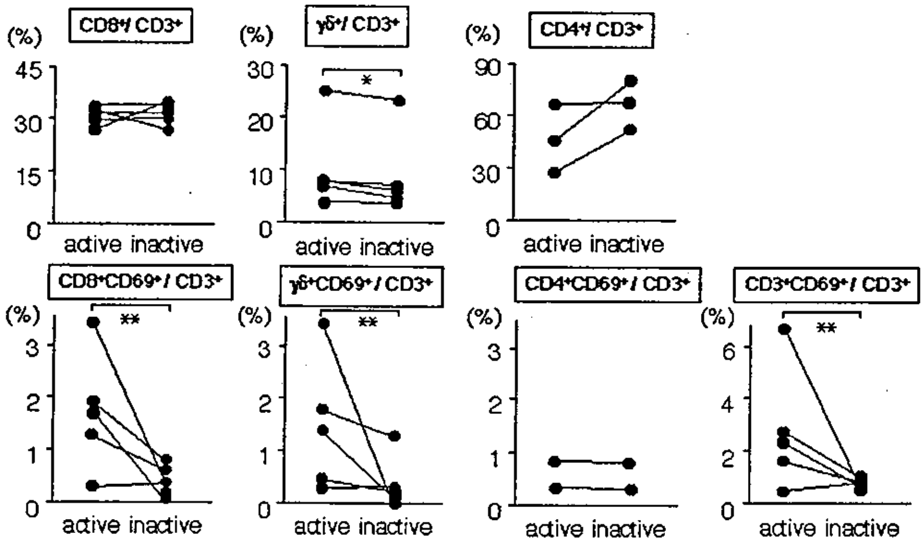


図1.　活動期および非活動期におけるCD3$^+$T細胞中のCD8$^+$, γδ, CD4$^+$T細胞比率の変化（上）ならびにCD3$^+$T細胞中のCD69を発現する各T細胞サブセット比率の変化（下)。*P ＜ 0.05, **P ＜ 0.1。

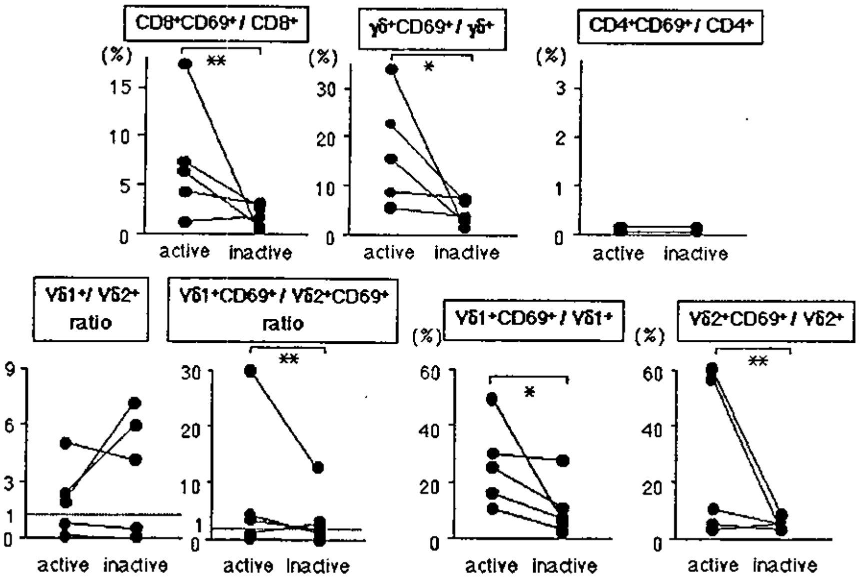


図2.　活動期および非活動期における各T細胞サブセット中のCD69$^+$細胞比率の変化（上)。Vδ1$^+$/Vδ2$^+$比, CD69を発現する活性化Vδ1$^+$/Vδ2$^+$比およびVδ1$^+$並びにVδ2$^+$γδT細胞中のCD69$^+$細胞比率の変化（下)。*P ＜ 0.05, **P ＜ 0.1。

厚生労働科学研究補助金（難治性疾患克服研究事業）分担報告書

ベーチェット病における IL-8 遺伝子多型

分担研究者　中村晃一郎（福島県立医科大学皮膚科）
研究協力者　尾山徳孝、古川裕利、柳堀浩克、橋本真一、井上智子
（福島県立医科大学皮膚科）
水木信久、西田朋美（横浜市立大学医学部眼科）

研究要旨

Interlukin-8(IL-8)は、白血球活性化因子であり、マクロファージ、血管内皮細胞、ケラチノサイトなどから産生される。BD において好中球機能亢進がみられ、血清 IL-8 値が BD の病勢を反映すること、粘膜病変での IL-8mRNA 発現が報告されている。BD 患者 70 名について IL-8 遺伝子（-353 領域）多型について解析した。健常人で TT 62.0%、TA 32.2%、AA 5.7% であり、BD 患者で TT 50.0%、TA 44.3%、AA 5.7%であり、BD 患者の TA genotype の頻度は健常人と有意差を認めなかった。今後他の領域において IL-8 遺伝子多型について解析を進める予定である。また本年度は生体防御レクチンである mannose binding lectin(MBL) の遺伝子多型（codon 54 G/A）解析を行った。BD 患者(30 名)の GA genotype 頻度は有意に高値であった。今後症例数を増加し検討する必要があると考えられた。

A. 研究目的

インターロイキン 8（IL-8)は白血球活性化因子であり、マクロファージ、血管内皮細胞、ケラチノサイトなどから産生されるサイトカインである。これまで我々は IL-8 上流域に存在する NF-kB、STAT-1 転写因子活性が、ケラチノサイトにおいて、IFN-γや TNF-αによって増強すること、また BD 皮膚病変部の表皮 KC で STAT-1 結成が増強することについて報告した。

BD の病態における IL-8 の重要性については、BD 患者粘膜病変部に IL-8, MCP-1, IL-12, IFN-γ mRNA 発現亢進を認める報告、血清 IL-8 値が BD の病勢のよいマーカーであるとする報告がみられ、BD の好中球浸潤における IL-8 の重要性が示唆される。またこれまで IL-8 遺伝子多型として、-845 から+678 領域まで 6 種類の遺伝子多型が報告されている。

MBL（マンノース結合レクチン）は、生体防御レクチンで、32kd のサブユニットの 3 分子がジスルフィド結合で架橋しユニットを形成し、さらにユニット間で架橋しオリゴマー構造を形成するレクチンである。MBL は病原体の糖鎖と結合し、さらに MASP (mannnose-binding lectin- associated serine protease)と結合し、これによって C4・C2 が分解され、補体反応を活性化される。これまで SLE、リウマチ患者で MBL 遺伝子にコドン 52 (CGT to TGT)、54 (GGC to GAC)、57 (GGA to GAA)の遺伝子多型が報告されている。また MBL 遺伝子の欠損患者では、血清 MBL 値が低値で、Neisiria meningitis, Plasmodium falciparum 感染などに対する抵抗性が減弱し、易感染性が認められる。MBL, ficolin などの生体防御レクチンはさまざまな糖鎖に結合し自然免疫において重要であると考えられる。

B. 研究方法

B. 研究方法:同意の得られた BD 患者 70 名、健常人 72 より末梢血 DNA を採取し、IL-8(-353)領域の遺伝子多型解析を施行した。次に、BD 患者 30 名、健常人 30 名から採取した DNA を用いて MBL 遺伝子 codon 54 (GGC から GAC)多型について解析を行った。

C. 研究結果：

健常人では IL-8 遺伝子　-353 領域で、TT genotype が 62.0%、TA genotype が 32.2%、AA genotype が 5.7%で、BD 患者では TT が 50.0%、TA が 44.3%、AA が 5.7%であった。BD における TA genotype の頻度に関しては健常人との間に有意差を認めなかった。

次に、BD 患者 30 名、健常人 30 名を用いて MBL 遺伝子多型 codon 54 GA SNP について解析した。A 群が wild type(codon 54 GGC)、

B 群が mutant type(GAC)とすると A 群はBanI 制限酵素処理下に 260bp, 89bp の band が認められ、B 群では 349bp の band がみられた。BD 患者では GA genotype 頻度は 14 例（46.7%）であり、健常人 20%に比べて、有意に高値を示した。BD 患者における HLA-B51 の有無と、MBL codon 54 TA SNP の発現頻度を比較した場合、BD 群では、MBLcodon54 GA SNP の存在する群においては、HLA-B51 陽性患者は 9 名で、HLA-B51 陰性患者 5 名であり、健常人と比べて有意差は認めなかった。また完全型、不全型の BD 患者における MBL の SNP 発現頻度を比較したところ、両者間に MBL SNP 頻度の有意な差異は認めなかった。

D. 考察・結論

IL-8 遺伝子多型に関して、promoter 領域(-353 領域)における遺伝子多型については健常人との間に有意差は認められず、今後他の 5 箇所の遺伝子多型についても解析する必要があると考えられた。

また本年度施行した生体防御レクチンである MBL 遺伝子多型については、BD 患者の MBL codon 54(GGC/GAC)遺伝子多型の頻度が健常人に比べて有意に増加していることから、MBL を介する経路が BD の溶連菌に対する易感染性と何らかの関連を生じる可能性が示唆された。今後症例を増加し検討する必要があると考えられた。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

１．論文発表

1. Tsunemi Y, Komine M, Sekiya T, Saeki H, Nakamura K, Hirai K, Kakinuma T, Kagami S, Fujita H, Asano N, Tanida Y, Wakugawa M, Torii H, Tamaki K. The -431C>T polymorphism of thymus and activation-regulated chemokine increases the promoter activity but is not associated with susceptibility to atopic dermatitis in Japanese patients. Exp Dermatol. 2004; 13(11):715-9.
2. Mitsui H, Watanabe T, Saeki H, Mori K, Fujita H, Tada Y, Asahina A, Nakamura K, Tamaki K. Differential expression and function of Toll-like receptors in Langerhans cells: comparison with splenic dendritic cells. J Invest Dermatol. 2004; 122(1):95-102.
3. Furukawa H, Miura T, Takahashi M, Nakamura K, Kaneko F, Ishii F, Komai R, Hashimoto T. A case of anti-p200 pemphigoid with autoantibodies against both a novel 200-kD dermal antigen and the 290-kD epidermolysis bullosa acquisita antigen. Dermatology. 2004; 209 (2): 145-8.
4. Yanagihori H, Tojo M, Inoue T, Nakamura K, Kaneko F, Nishida T, Mizuki N. Lack of association of interleukin-12 p40 gene (IL12B) polymorphism with Behcet's disease in the Japanese population. J Dermatol Sci. 2004; 34(2):112-4.
5. Wang H, Nakamura K, Inoue T, Yanagihori H, Kawakami Y, Hashimoto S, Oyama N, Kaneko F, Fujita T, Nishida T, Mizuki N. Mannose-binding lectin polymorphisms in patients with Behcet's disease. J Dermatol Sci. 2004; 36(2):115-7.

2. 学会発表

1. Functional analysis of human vascular endothelial growth factor using a transgenic approach: the possible implication in establishing psoriasis model mouse. Yanagihori H, Nakamura K, Oyama N, Tsunemi Y, Saeki H, Tamaki K. The 65th Annual Meeting of the SID 2004. April 28- May 1. Rhode Island
2. The regulation of STAT-1 and NFKB binding activity in human keratinocytes HaCaT cells. Nakamura K, Oyama N, Kaneko F, Tsunemi Y, Saeki Y, Tamaki K. The 65th Annual Meeting of the SID 2004. April 28- May 1. Rhode Island

G. 知的財産の出願・登録状況

１．特許取得

なし

２．実用新案登録

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

ぶどう膜炎患者の血清中 soluble CD44 濃度

分担研究者：川島秀俊　さいたま赤十字病院眼科
共同研究者：蕪城俊克　東京大学医学部付属病院眼科吉田淳
高本光子　東京都老人医療センター
吉田　淳　東京都老人医療センター眼科
沼賀二郎　東京都老人医療センター眼科
藤野雄次郎　東京厚生年金病院眼科

研究要旨

【目的】ベーチェット病とサルコイドーシスは本邦で頻度の高い内因性ぶどう膜炎であり、かつ類似した所見を呈する事がある事から、鑑別に迷うことがある。リンパ球表面マーカーCD44 は、リンパ球の細胞外基質への接着に関与する分子で、この可溶型分子 soluble CD44(sCD44)がサルコイドーシス患者の血清中に高濃度に存在するとの報告がある。sCD44 がぶどう膜炎の診断マーカーとして有用性を調べる目的で、血清中 sCD44 濃度を測定した。【方法】免疫抑制剤全身投与の無いぶどう膜炎初診患者 70 例（男性 34 例、女性 36 例）、正常人 32 例(男性 19 例、女性 13 例)から採取した血清を凍結保存し、sCD44 濃度を ELISA 法で測定した。【結果】原因疾患別の血清中 sCD44 濃度(ng/ml)は、サルコイドーシスで 848±256 と高値であったのに対し、ベーチェット病では 374±61、正常人では、357±81 であった。サルコイドーシス患者及びサルコイドーシス疑い患者では、正常人と比べ血清中 sCD44 濃度が有意に高値であったのに対し、その他のぶどう膜炎では正常人と有意差はなかった。特に、ベーチェット病では眼活動性が高いにも関わらず低値であった。【結論】血清中 sCD44 濃度測定はぶどう膜炎患者におけるベーチェット病とサルコイドーシスの診断マーカーとなりうると考えられたが、さらなる検討が必要である。

A．研究目的

ベーチェット病は、我が国におけるぶどう膜炎の中で頻度の高い疾患として知られている。近年、軽症化、あるいは頻度の減少が報告されているが、免疫抑制剤の併用療法を行っても眼発作を繰り返して視力が徐々に低下する症例はなお数多く、定期的な経過観察・治療が必要となる重要な疾患である事には変わりはない。

一方、我が国のぶどう膜炎で頻度が高い疾患としては、ベーチェット病の他に、サルコイド

ーシス、Vogt-小柳-原田病がある。[1]この中で、サルコイドーシスは1988年に厚生省(現在の厚生労働省）による診断基準が作成された以降、診断率が増加して増加傾向にある。

ベーチェット病によるぶどう膜炎の臨床的特徴は、眼発作と呼ばれる様に急性に増悪する事が多い事、前房蓄膿を伴う非肉芽腫性虹彩炎、網膜血管炎、蛍光眼底造影でのシダの葉状蛍光漏出などが挙げられる。一方、サルコイドーシスによるぶどう膜炎の臨床的特徴としては、ベーチェット病と比べると眼内の炎症が慢性的に持続する傾向がある事、肉芽腫性虹彩炎、虹彩結節、隅角結節、テント状周辺虹彩癒着、雪玉状硝子体混濁、網膜静脈周囲炎、candlex wax exudate、網膜周辺部の散在性瘢痕病巣などが挙げられる。ベーチェット病とサルコイドーシスはいずれも明確な診断基準が定められており、鑑別が容易である場合も多いが、中には鑑別診断に苦慮する症例も存在する。例えば、蛍光眼底造影でのシダの葉状蛍光漏出はベーチェット病に特徴的であるとされているが、若年の活動性の高いサルコイドーシス症例でもしばしば見られる。また、サルコイドーシスに特徴的とされる雪玉状硝子体混濁やcandlex wax exudateは、ベーチェット病でも類似の眼底所見が観察される事がある。両疾患は、我が国におけるぶどう膜炎の中で頻度が高い為、臨床上鑑別診断に苦慮する事がある。しかも両疾患は、治療法、特にステロイド内服の使用の是非に関する考え方が全く異なる為、より鑑別診断を厳密に行う必要があると考えられる。

白血球表面マーカーの１つであるCD44は、白血球の細胞外基質（コンドロイチン硫酸）への接着、血管外への遊走、免疫応答、T細胞活性化、悪性腫瘍の転移などに関与する分子である。近年、このCD44が、サルコイドーシス患者の２型肺胞上皮細胞で高度に発現している事が報告されている。[2]さらに、このCD44の脱落産物である可溶性CD44(soluble CD44: 以下sCD44)が、サルコイドーシス患者の血中で高濃度であると近年報告された。[3]しかし、サルコイドーシスによるぶどう膜炎を含め、ぶどう膜炎患者における血清中sCD44濃度を検討した報告は、未だ報告されていない。

今回、我々はsCD44がぶどう膜炎の診断マーカー、特にベーチェット病とサルコイドーシスの鑑別診断の指標として有用であるかを調べる目的で、ぶどう膜炎患者および正常人の血清中sCD44濃度を測定した。

B. 対象・方法

対象は2002年10月から2004年3月までに東京大学付属病院眼科を初診した活動性ぶどう膜炎患者で、初診時に活動性の眼炎症所見を認め、且つそれまでに免疫抑制剤の全身投与を受けていない症例70例（男性34例、女性36例、平均年齢47.5±15.5才）である。活動性の眼病変を認めない症例や、前医で免疫抑制剤の全身投与を処方されていた症例は除外した。採血は、通常行われるぶどう膜炎の原因精査の為の血液検査の一環として、患者の同意の元に行った。コントロールとして、正常人32例 （男性19例、女性13例、平均年齢43.7±12.8才）に対しても採血を行った。採血した血液は、速やかに血清採取用試験管に入れて遠心して血清を採取し、分注して-80度で凍結保存した。

血清中sCD44濃度の測定は、sCD44ELISAキット（Biosource社）を用いた。96穴プレート間の測定誤差を補正する為に、標準血清を2サンプル用意して全プレートで測定する事とし、プレート毎のばらつきを補正した。

対象としたぶどう膜炎患者70例の病名別内訳は、表1の通りであった。

C. 結果

ぶどう膜炎の原因病名が確定した50症例と正常人32例の比較では、血清中sCD44濃度は、サルコイドーシス(n=9):848±256、ベーチェット病(n=6):374±61、原田病(n=10):434±117、急性前部ぶどう膜炎(n=9):395±93、結核性ぶどう膜炎(n=2):484±147、視神経網膜炎(n=2):432±81、寄生虫性ぶどう膜炎(n=2):372±41、強膜炎(n=2):399±94、その他のぶどう膜炎診断例(n=8):430±146、正常人(n=32):357±81であった。サルコイドーシスぶどう膜炎患者で正常人に比べ有意に高値であった($p<0.01$, Mann-Whitney' s U-test)。(図1) 一方、ベーチェット病、Vogt-小柳-原田病、その他のぶどう膜炎では、正常人と比較して有意差は無かった。ベーチェット病では、各症例とも眼活動性が高いにも関わらず血清中sCD44濃度は低値であった。

ぶどう膜炎の原因病名が確定しないかった疑診症例20例における検討では、サルコイドーシス疑い(n=12):437±92、ベーチェット病疑い(n=2):390±90、急性前部ぶどう膜炎疑い(n=3):377±70、診断不能例(n=3):361±58ng/mlであった。(図2) サルコイドーシス疑い群には、正常人に比べ血清中sCD44濃度が高値の症例があり、統計学的な有意差を認めた($p<0.05$, Mann-Whitney' s U-test)。一方、ベーチェット病疑い、急性前部ぶどう膜炎疑い例、その他の症例では正常人と比べ、有意差は無かった。

sCD44濃度のカットオフ値を550ng/mlとすると、サルコイドーシス群では88.9%が陽性となった。一方、サルコイドーシス疑い群では8.9%、ベーチェット病では0%、Vogt-小柳-原田病では20%、その他のぶどう膜炎での陽性率は10%程度、正常人では3.1%の陽性率であった。(図3) この事から、血清中sCD44濃度は、サルコイドーシスぶどう膜炎症例のみで特に高値であり、ぶどう膜炎患者におけるサルコイドーシスの診断マーカーに使える可能性が示唆された。

4名の新規発症のサルコイドーシスぶどう膜炎患者について、発症直後と発症数ヶ月後に血清中sCD44濃度を測定した。その結果、sCD44濃度は初診時で高く、初診時よりぶどう膜炎の活動性が低下した数ヶ月後には有意に低下していた($p=0.017$, Student' s paired t-test)が、正常人よりは高い水準にあった。一方、サルコイドーシス発症から数年～十数年経過した非活動性のサルコイドーシス患者4名では、sCD44濃度は正常人と同等であった。(図4)

D. 考案

CD44は、白血球の血管外遊走、細胞外基質への接着を始め、T細胞活性化、悪性腫瘍の転移などに関与する白血球表面マーカーである[3]。この脱落産物であるsoluble CD44(sCD44)は、血液中に存在し、CD44のantagonistとして免疫応答の調節に関与していると推測されている。[7]

これまでに、血清中Soluble CD44が上昇する疾患として、悪性腫瘍(胃[4]、大腸[4]、腎、乳ガンなど)、悪性血液疾患(悪性リンパ腫[5]、白血病[6]など)、サルコイドーシス[3]、膠原病(PSS, SLE)[7]が報告されている。今回、サルコイドーシスぶどう膜炎の診断マーカーとしての血清中sCD44の有用性を検討する目的で、ぶどう膜炎患者の初診時血清中のsCD44を測定した。

その結果、血清中sCD44は正常人と比べ、サルコイドーシス患者で有意に高値であった。他のぶどう膜炎では、多発性骨髄腫の眼内浸潤の1例で高値であった他は、特に高値を示すぶどう膜炎疾患は無かった。血清中sCD44は悪性腫瘍を持つ症例では、高値となる事に注意する必

要がある。サルコイドーシス疑診例の中に、若干高値を示す症例が認められた。

サルコイドーシスの活動性と良く相関する血清中物質として、ACE(angiotensin converting enzyme)が知られており[8]、サルコイドーシス臨床診断群の診断基準にも含まれている。サルコイドーシスにおいてACEはマクロファージ様肉芽腫細胞から産生される事が報告されている。[9]一方、正常人における血清中sCD44は殆どリンパ球由来と考えられている。[10]サルコイドーシスで血清中sCD44上昇する原因は不明であるが、BAL fluid中のsCD44濃度は正常人と同等である事から、肺病変が原因ではなく、サルコイドーシスの自己免疫疾患的側面を反映しているのではないかと推測されている。[3]

また、サルコイドーシスぶどう膜炎患者の血清中sCD44濃度は、初診時で高く、ぶどう膜炎の活動性が低下した数ヶ月後には有意に低下していた。発症後数年の非活動性サルコイドーシス患者では、正常人と同等であった。この事から、血清中sCD44濃度はサルコイドーシスぶどう膜炎の活動性を反映するのではないかと推測した。

E．結論

以上の結果から、sCD44がぶどう膜炎の診断マーカー、特にベーチェット病とサルコイドーシスの鑑別診断の指標として有用である事が示唆された。しかし今回の検討では、症例数が十分に多いとは言えないので、今後さらに症例数を増やして検討を行う予定である。

引用文献

1) 谷合厚，清水一之，沼賀二郎，藤野雄次郎：東大病院眼科の内因性ブドウ膜炎患者の臨床統計(1994～1997年)日本眼科紀要 51(6)、564-568;2000.

2) Na J, Wang G, Wang R, et al.: A study of the expression of CD(44) in pneumo-cytes in pulmonary sarcoidosis. Chung-Hua Chieh Ho Ho Hu His Tsa Chih Chinese Journal of Tuberculosis & Respiratory Diseases. 25(10):613-6, 2002.

3) Kasuga I, Minemura K, Nasu H et al.: Elevated serum soluble CD44 level in sarcoidosis. International Journal of Molecular Medicine. 6(6):679-82, 2000.

4) Guo YJ, Liu G, Wang X, et al.: Potential use of soluble CD44 in serum as indicator of tumor burden and metastasis in patients with gastric or colon cancer. Cancer Research. 54(2):422-6, 1994.

5) Niitsu N, Iijima K: High serum soluble CD44 is correlated with a poor outcome of aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Leukemia Research. 26(3) :241-8, 2002.

6) De Rossi , Marroni P, Paganuzzi M et al.: Increased serum levels of soluble CD44 standard, but not of variant isoforms v5 and v6, in B cell chronic lymphocytic leukemia. Leukemia. 11(1):134-41, 1997.

7) Ohyashiki K, Ando K, Hayashi S et al.: Soluble CD44 level in non-malignant disorders is associated with autoimmune backgrounds. Autoimmunity. 30(1): 35-6, 1999.

8) Lieberman J. Elevation of serum angiotensin-converting-enzyme (ACE) level in sarcoidosis. American Journal of Medicine. 59(3):365-72, 1975

9) Silverstein E, Pertschuk LP, Friedland J: Immunofluorescent localization of angiotensin converting enzyme in epithelioid and giant

cells of sarcoidosis granulomas. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 76(12):6646-8, 1979.

10) Bazil V, Horejsi V: Shedding of the CD44 adhesion molecule from leukocytes induced by anti-CD44 monoclonal antibody simulating the effect of a natural receptor ligand. Journal of Immunology. 149(3):747-53, 1992.

F．健康危険情報

なし

G．研究発表

1. Atsushi Yoshida, M.D., Hidetoshi Kawashima, M.D., Yuta Motoyama, M.D., Hirobumi Shibui, M.D., Atsushi Taniai, M.D., Mayumi Kitagawa, M.D., Toshikatsu Kaburaki, M.D., Kazuyuki Shimizu, M.D., Yasuho Izawa, M.D., Kiyofumi Hayashi, M.D., Jiro Numaga, M.D., Yujiro Fujino, M.D., and Kannjiro Masuda: The statistical comparison of patients with Behcet'sdisease between the 1980's and the 1990's. Ophthalmology. 111:810-815. 2004.
2. Kazuhide Akiyama, Jiro Numaga, Fumie Kagaya, Yutaka Takazawa, Shigenobu Suzuki, Nobuyuki Koseki, Satoshi Kato, Toshikatsu Kaburaki, and Hidetoshi Kawashima. A case of Optic Nerve Involvement in Metastasis of Gastrointestinal Stromal Tumor. Jpn J Ophthalmol. 48:166-168. 2004.
3. Ohno S, Nakamura S, Hori S, Shimakawa M, Kawashima H, Mochizuki M, Sugita S, Ueno S, Yoshizaki K, and Inaba G.: Efficacy, safety, and pharmacokinetics of multiple administration of infliximab in Behcet's disease with refractory uveoretinitis. J Rheumatol. 31:1362-1368. 2004.
4. Dale S Gregerson and H Kawashima. APC derived from donor splenoctes support retinal autoimmune disease in allogeneic recipients. J Leukocyte Biology. 76:383-387. 2004.
5. 蕪城俊克、沼賀二郎、藤野雄次郎、川島秀俊(東京大)．ベーチェット病に対する長期低容量ステロイド併用療法．平成 15 年度厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班班．平成 15 年度研究業績．pp65-70. 2004.
6. 藤村茂人、蕪城俊克、沼賀二郎、藤野雄次郎、川島秀俊(東京大)．ベーチェット病などのぶどう膜炎に続発する緑内障の臨床統計．平成 15 年度厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班班．平成 15 年度研究業績．pp60-64. 2004.
7. 蕪城俊克、川島秀俊：ぶどう膜炎併発緑内障における手術の適応・術式の選択・術後処置．あたらしい眼科． 21:13-19． 2004.
8. 川島秀俊：赤ちゃんの病気&ホームケア事典．第?章.体の部位の異常ー目．ひよこクラブ 6 月号．ベネッセコーポ レーション．p179-p182. 2004.
9. 川島秀俊：免疫抑制薬．眼薬理． 18:44－46. 2004.
10. 川島秀俊：59.急性出血性結膜炎．感染症．竹田美文、木村哲編集．朝倉書店． 280-281． 2004
11. 川島秀俊：60.流行性角結膜炎．感染症．竹田美文、木村哲編集．朝倉書店．356-358. 2004
12. 川島秀俊：複視．BRAIN． 77:6-7.日本脳神経財団． 2004

H．知的財産権の出願・登録状況

なし

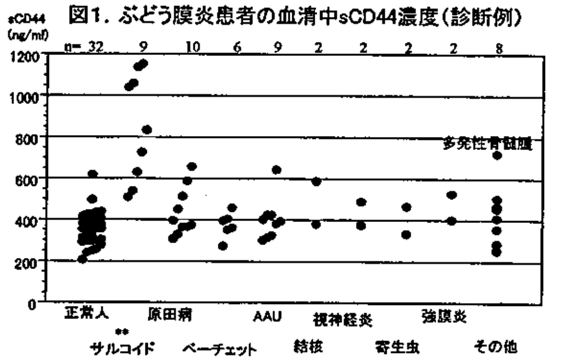
表1.　対象としたぶどう膜炎患者70例の病名別内訳

診断例 (n=50)	
サルコイドーシス	9例
（うち・病理診断群	2例
・臨床診断群	7例）
ベーチェット病	6例
Vogt・小柳・原田病	10例
急性前部ぶどう膜炎(AAU)	9例
結核性ぶどう膜炎	2例
視神経網膜炎	2例
寄生虫性ぶどう膜炎	2例
強膜炎	2例
その他	8例

(Posner, HTLV-1, 桐沢型, Fuchs, HSV虹彩炎など)

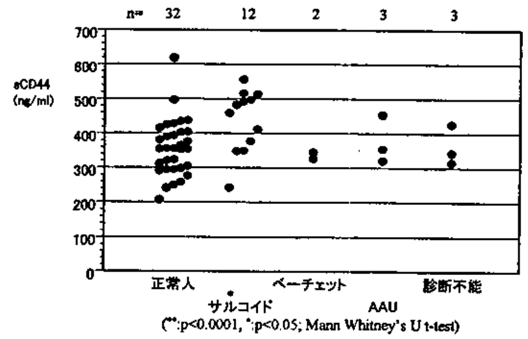
疑診例 (n=20)	
サルコイドーシス疑い	12例
ベーチェット病疑い	2例
AAU疑い	3例
診断不能例	3例

図1. ぶどう膜炎患者の血清中sCD44濃度（診断例）



(**:p<0.0001, *:p<0.05; Mann Whitney's U t-test)

図2. ぶどう膜炎患者の血清中sCD44濃度（疑診例）

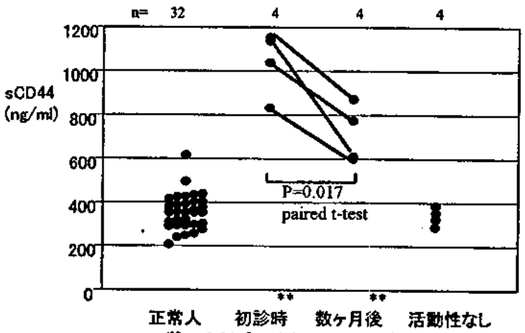


(**:p<0.0001, *:p<0.05; Mann Whitney's U t-test)

図3. sCD44濃度のカットオフ値と疾患別陽性率

	n=	>=500ng/ml	>=550ng/ml	>=600ng/ml
サルコイドーシスぶどう膜炎	9	100	88.9	77.8
サルコイドーシスぶどう膜炎疑い	12	25	8.3	0
原田病	10	30	20	10
ベーチェット病	6	0	0	0
AAU	9	11.1	11.1	11.1
その他(確定)	16	25	12.5	6.25
その他(疑診)	8	0	0	0
正常人	32	3.1	3.1	3.1

図4. サルコイドーシス患者のぶどう膜炎活動性とsCD44濃度



(**:p<0.01, *:p<0.05; Mann Whitney's U t-test)

塩基性抗菌蛋白（CAP18/LL37）抗菌ペプチドによるヒト活性化T細胞のアポトーシス誘導

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　奥村一彦　北海道医療大学歯学部口腔外科学教室
磯貝　浩　札幌医科大学医学部実験動物施設
南場研一　北海道大学大学院医学研究科視覚器病学分野
大野重昭　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
小熊惠二　岡山大学医学部細菌学教室
金子史男　福島県立医科大学医学部皮膚科

研究要旨
我々はCathelicidinファミリー塩基性抗菌蛋白（CAP18/LL37）の活性ドメインが強い抗菌活性を示し、実験的ブドウ膜炎の発症を抑制することを報告した。さらに、この抗菌ペプチドは癌細胞に対してミトコンドリアパスウェイを介してアポトーシスを誘導することを見いだした。この作用は休止期の正常細胞に対しては認められないが、活性化した免疫細胞には作用するかもしれない。そこで、活性化したT細胞制御に対する作用を検討した。
活性化Tリンパ球はCAP18/LL37の活性ドメイン添加によって、DNAの断片化を起こした。細胞数は72時間目まで対照と同様の増加を示したが、その後、有意に減少した。このことは癌細胞に対して認められたミトコンドリアパスウェイを介してのアポトーシスと同様の機序であると考えられた。癌細胞では効果が即時的に現れるが、活性化T細胞では効果発現時間の遅滞が見られた。以上の結果は、CAP18/LL37が強い抗菌活性およびLPS/LTA中和活性を示すだけでなく、過剰反応を示したリンパ球の制御にも関わっていることを示唆している。

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１８ｋＤａ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し、細胞壁、リポタイコ酸に結合することを報告した。本菌由来の細胞壁はのブドウ膜炎誘導を示すが、その活性は CAP18 合成ペプチドによって中和された。我々はこの抗菌ペプチドが癌細胞に対してミトコンドリアパスウェイを介してアポトーシスを誘導することを見いだした。本研究では、CAP18合成ペプチドが細菌側だけでなく、活性化した免疫細胞に作用するかもしれないと考えた。そこで、活性化した T 細胞に対する作用を検討した。

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)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。比重遠心法にて得たリンパ球は hrIL-2 存在下で培養し、活性化には PHA-L(Leucoagglutinin) を用いた。CAP18 合成ペプチドで処理後、細胞の生存率を経時的にトリパンブルー染色法で調べた。ＤＮＡの断片化は SDS-PAGE でラダー状態を調べ、Tunnel 法で確認した。

アポトーシス誘導初期に生じるミトコンドリアの膜電位変化は、それを生細胞で観察できるMitoCapture染色(BioVision)で調べた。

C．研究結果

hCAP18 活性ドメインの合成ペプチドによって活性化T細胞では DNA の断片化を認めた。一方、静止期のT細胞では DNA の断片化を認めた（Fig.2)。Tunnel法での染色で静止期T細胞は染色されないのに対し、活性化T細胞は染色像を示した。合成ペプチド処理後の活性化T細胞数を調べたところ、７２時間目までは対照（静止期T細胞）との間に有意差を認めないが、９６時間目以降では有意な細胞数の減少を示した（Fig.３)。アポトーシス誘導初期に生じるミトコンドリアの膜電位変化はMitoCapture染色で緑色蛍光を確認できる。一方、アポトーシスを起こさない細胞はオレンジ色となる。合成ペプチド処理後の活性化T細胞は40μg/ml以上の濃度で緑色蛍光を示した。

D．考察

以上の結果は、CAP18/LL37は活性化T細胞にアポトーシスを誘導し、過剰反応を示したリンパ球の制御に関与することを示唆している。また、効果発現するまでの時間は癌細胞に比べて、活性化T細胞ではゆっくりしたものであった。このことは、荷電の状態やP2X7受容体の分布など細胞表面の性質の違いが反映しているのかもしれない。

E．結論

CAP18 活性ドメインは抗菌作用を示すだけでなく、活性化した宿主細胞をアポトーシスに導いた。CAP18活性ドメインは過剰反応を示したリンパ球の制御にも関わっていることを示唆している。

Cathelicidinファミリー塩基性抗菌蛋白は多機能性を有している。ベーチェット病では、外因として細菌感染の制御と活性化したT細胞の制御という双方向性の作用を期待できる。さらに、粘膜上皮の修復や再生にも関与することが報告されている。このことは口腔アフタの早期治癒に応用できるかもしれない。

hCAP18は生体内にもともと存在し、かつ使用した濃度よりも高い濃度の臓器もある。静止期の細胞には作用せず、副作用もないことから、今後の治療に使用可能と考えられた。

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

なし

総説

１．　磯貝恵美子、磯貝　浩：ライム病　畜産の研究特集号「人獣共通感染症」58(1)：139-144，2004

２．　磯貝恵美子：　電磁波の生体作用と健康への被害、北海道医療大学情報センター年報　2:3-14，2004

原著

1. Kobayashi-Sakamoto M, Isogai E, Hirose K, Chiba I: NF-kappaB dependent induction of osteoprotegrin by *Porphyromonas gingivalis* in endothelial cells. BBRC 315, 107-112, 2004
2. Isogai E, Hirata M, Isogai H, Matuo K, Watarai S, Miura H, Oguma K: Antimicorbial and lipopolysaccharide-bindining activities of C-terminal domain of human CAP18 peptides to Genus *Leptospira*. J Appl Res 4(1), 180-185, 2004
3. Okumura K, Itoh A, Isogai E, Hirose K, Hosokawa Y, Abiko Y, Hirata M, Isogai H: C-terminal domain of human CAP18 antimicrobial peptide induces apoptosis in oral squamous cell

carcinoma SAS-H1 cells. Cancer letter 212(2), 185-194, 2004

4. 菊池 統、村井弘之、池添浩二、川尻真知、大八木保政、磯貝恵美子、吉良潤一: *Borrelia afzelii*感染にともなう好酸球性筋膜炎の一例. 臨床神経学 44 (4-5), 299-302, 2004
5. Kawahara M, Rikihisa Y, Isogai E, Takahashi M, Misumi H, Suto C, Shibata S, Zhang C, Tsuji M: Ultrastructure and phylogenic analysis of 'candidatus neoehrlichia mikuraensis' in the family *Anaplasmataceae* isolated from wild rats and found in *Ixodes ovatus* ticks. Int J Syst Evol Micorobiol 54(5), 1837-1843, 2004
6. Takaya A, Suzuki A, Kikuchi Y, Eguchi M, Isogai E, Tomoyasu T, Yamamoto T Derepression of *Salmonella* pathogenicity island 1 genes within macrophages leads to rapid apoptosis via caspase-1- and caspase-3-dependent pathways Cellular Microbiol, in press, 2004
7. Kurauchi T, Yokota K, Matuo T, Fujinami Y, Isogai E, Isogai H, Ohtsuki H, Oguma K: Neutrophil and lymphocyte responses to oral Streptococcus in Adamantiades-Bechet's disease. FEMS Immunol Med Microbiol, in press, 2004

２. 国際学会発表

1. Kawahara M, Tahara K, Itagaki A, Isogai E, Tajima T, Rikihisa Y. High prevalence of deer infection with Anaplasma and Ehrilichia spp. in Japan. 104th General Meeting of ASM, New Orleanss, LA,USA, 2004
2. Nishikawa T, Isogai E, Isogai H, Ohba T, Yunoki S, Okayasu T, Arashima K, Tanaka, K, Adachi K. Bactericidal effects of human cationic antimicrobial protein 18 (hCAP18) and its analogues on pathogenic bacteria. 104th General Meeting of ASM, New Orleanss, LA,USA, 2004
3. Isogai H, Okumura k, Hirose K, Isogai E, Nishikawa T. Synergistic antitumor effects of CAP18 peptide with other antimicrobial proteins from mammalian and bacteria. 104th General Meeting of ASM, New Orleanss, LA,USA, 2004
4. Yunoki S, Osada Y, Kono H, Erata T, Isogai E, Takai M. Role of ethanol in improvement of bacterial cellulose production: analysis using 13C-labeled carbon sources. 104th General Meeting of ASM, New Orleanss, LA,USA, 2004
5. Takaya A, Tomoyasu T, Tokumitsu A, Matsui M, Isogai E, Yamamoto T. DnaK/DnaJ chaperone machinery I essential for expression of SP11 genes through the modulation of HilA function. 104th General Meeting of ASM, New Orleanss, LA,USA, 2004
6. Isogai E, isogai H, Matuo K, Kaneko F, Sugiyuama T, Ohno S. Anti-mannan antibodies and mannose binding protein in patients with Behcet's disease in Japan. XI. International Conference on Behcet's disease. Antalya, Turkey, 2004
7. Isogai E, Okumura, Isogai H, Kaneko F, Oguma K, Ohno S. Effect of human cationic antimicrobial protein 18 peptide on streptococcal cell wall induced uveitis in mouse. XI. International Conference on Behcet's disease. Antalya, Turkey, 2004

H. 知的財産権の出願、登録状況

特記事項なし。

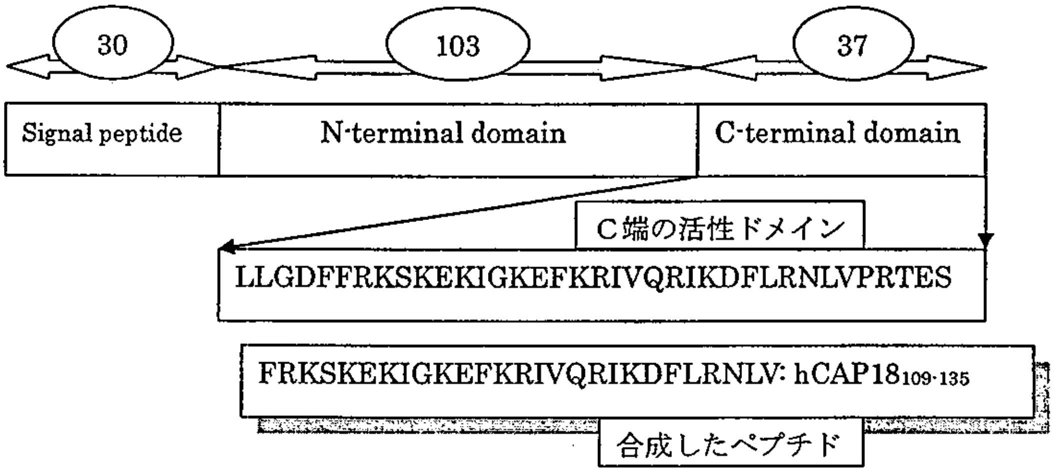


Fig.1 CAP18 活性ドメインのアミノ酸シークエンス

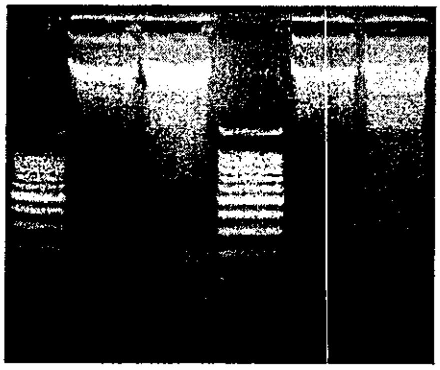


Fig. 2 hCAP18 活性ドメインの合成ペプチドによる活性化T細胞における DNA の断片化

Lane1,4: マーカー、Lane2,5: 対照静止期T細胞、Lane3: 合成ペプチド (40μg/ml) で処理した活性化T細胞、Lane6: 合成ペプチド (80μg/ml) で処理した活性化T細胞

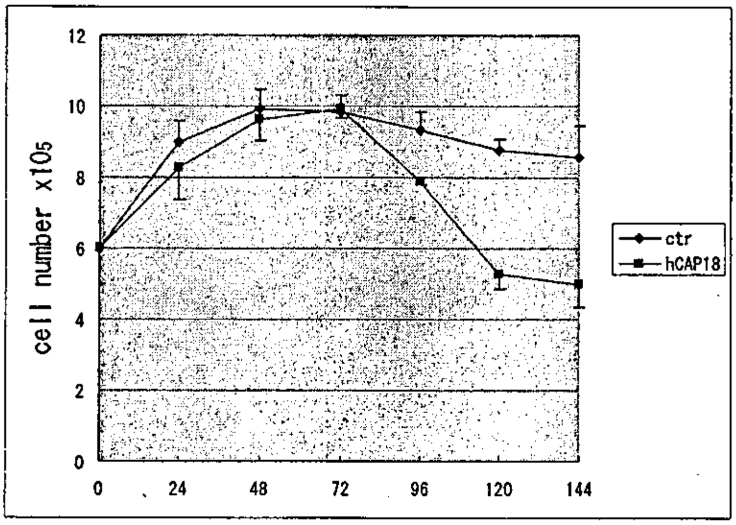


Fig. 3 合成ペプチド処理後の活性化T細胞数の減少

ペプチド処理後72時間目までは対照 (静止期T細胞) との間に有意差を認めないが、96時間目以降では有意な細胞数の減少を示している。