

表1. インターロイキン遺伝子のスクリーニング結果

gene	chr	locus	gene	chr	locus
<u>IL1*</u>	2	q14-q14.2	<u>IL17C</u>	16	q24
IL2	4	q26-q27	IL17D	13	q12.11
IL3	5	q31.1	IL17E	14	q11.2
IL4	5	q31.1	IL17F	6	p12
<u>IL5</u>	5	q31.1	IL18	11	q22.2-q22.3
IL6	7	p21	IL19	1	q31-q32
IL7	8	q12-q13	IL20	1	q31-q32
<u>IL8</u>	4	q13-q21	IL21	4	q26-q27
IL9	5	q31.1	IL22	12	q15
IL10	1	q31-q32	IL23A	12	q13.3
IL11	19	q13.3-q13.4	IL24	1	q31-q32
IL12A	3	p12-q13.2	IL26	12	q15
IL12B	5	q31.1-33.1	IL27	16	p12.1
<u>IL13</u>	5	q31.1	<u>IL28A</u>	19	q13.13
<u>IL15</u>	4	q31	<u>IL28B</u>	19	q13.13
IL16	15	q26.3	<u>IL29</u>	19	q13.13
IL17	6	p12	IL31	12	q24.31
IL17B	5	q32-q34	<u>IL32</u>	16	p13.3

* 遺伝子近傍100kb内に陽性マーカーが存在する遺伝子を下線付き太字で示す

表2.CC型ケモカインのスクリーニング結果

gene	chr	locus	receptors	gene	chr	locus	receptors
CCL1	17	q12	CCR8	<u>CCL17</u>	16	q13	<u>CCR4</u>
CCL2	17	q11.2-q21.1	CCR2	CCL18	17	q11.2	?
CCL3	17	q11-q21	<u>CCR1,CCR5</u>	CCL19	9	p13	CCR7
CCL4	17	q12	<u>CCR5</u>	CCL20	2	q33-q37	CCR8
<u>CCL5*</u>	17	q11.2-q12	<u>CCR1,CCR3,CCR5</u>	CCL21	9	p13	CCR7
CCL7	17	q11.2-q12	<u>CCR1,CCR2,CCR3</u>	CCL22	16	q13	<u>CCR4</u>
CCL8	17	q11.2	<u>CCR3,CCR5</u>	CCL23	17	q12	<u>CCR1</u>
CCL11	17	q21.1-q21.2	<u>CCR3</u>	CCL24	7	q11.23	<u>CCR3</u>
CCL13	17	q11.2	CCR2, <u>CCR3</u>	<u>CCL25</u>	19	p13.2	CCR9
CCL14	17	q11.2	<u>CCR1</u>	CCL26	7	q11.23	<u>CCR3</u>
CCL15	17	q11.2	<u>CCR1,CCR3</u>	CCL27	9	p13	CCR10
CCL16	17	q11.2	<u>CCR1,CCR3,CCR5</u>	CCL28	5	p12	<u>CCR3,CCR10</u>

* 遺伝子近傍100kb内に陽性マーカーが存在する遺伝子を下線付き太字で示す

表3.CXC型ケモカインのスクリーニング結果

gene	chr	locus	receptors	gene	chr	locus	receptors
CXCL1	4	q21	CXCR2	CXCL10	4	q21	CXCR3
CXCL2	4	q21	CXCR2	CXCL11	4	q21.2	CXCR3
CXCL3	4	q21	CXCR2	<u>CXCL12</u>	10	q11.1	CXCR4
CXCL4	4	q12-q21	?	CXCL13	4	q21	CXCR6
CXCL5	4	q12-q13	CXCR2	CXCL14	5	q31	?
CXCL6	4	q21	CXCR1,CXCR2	CXCL16	17	q13	CXCR6
CXCL7	4	q12-q13	CXCR2	XCL1	1	q23	XCRI
<u>CXCL8*</u>	4	q13-q21	CXCR1,CXCR2	XCL2	1	q23-25	XCRI
CXCL9	4	q21	CXCR3	CX3CL1	16	q13	<u>CX3CR1</u>

* 遺伝子近傍100kb内に陽性マーカーが存在する遺伝子を下線付き太字で示す

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

ペーチェット病における炎症に関与している細菌抗原に関する研究

分担研究者 小熊恵二 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 教授
研究協力者 横田憲治 岡山大学医学部保健学科 助教授
申 蓮花 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

研究要旨

ペーチェット病（以下 BD）患者の口腔内から連鎖球菌を分離し、患者との免疫反応や、菌の病原因子について報告してきた。特に患者由来 113-20 株に対する IgA 抗体価が、場所、年代が異なる BD 患者の血清でも常に高く、患者が特異的に反応する抗原は菌のピルビン酸キナーゼという蛋白であることを同定した。

A. 研究目的

我々は、ペーチェット病（以下BD）患者からATCC基準株と抗原性の異なる113-20、114-23、118-1株を分離し、患者との免疫反応や、菌の病原因子について報告してきた。特に113-20に対するIgA抗体価が、場所、年代が異なるBD患者の血清でも、常に高いことを報告してきた。今回、BD患者血清が特異的に反応する113-20株菌体抗原の検索を行った。また、113-20株は、ヒトリンパ球からのIL-8やTNFの産生を強く誘導することから、菌のどのような成分が、このサイトカイン誘導に関与しているのか検索した。

B. 研究方法

BD患者由来の株（113-20,114-23,118-1）3株と口腔内細菌の基準株（*S. sanguinis*: ATCC10056, *S. oralis*: ATCC10557, *S. salivarius*: ATCC7073, *S. pyogenes*: WHO-T12）4株の計7種類の菌株をTodd-Hewitt培地で培養し、遠心により集菌した。培養上清の蛋白成分は、硫酸により沈殿させた。菌体は、超音波にて破碎し、遠心により分画した。北大眼科からのBD患者60人と岡大皮膚科からのBD患者90人、計150人の血清を用いて、IgA抗体価をELISA法で測り、その反応が高い血清を使い、Western Blotにより、患者血清が反応する分子を検索した。また抗対価の高い患者の反応したバンドを切り取り、アミノ酸シーケンスにより蛋白抗原を同定した。

また、単球系培養細胞(NOMO1、 10^6 cell/ml)に菌体成分および培養上清（硫酸沈殿済み）を作用させ、24時間後に培養上清を回収し、ELISA法によりIL-8および

TNF- α を測定した。113-20の場合は、硫酸沈殿させた菌体成分も作用させた。

（倫理面への配慮）

抗体価測定は血清は、番号管理し個人特定は出来ないよう管理した。

C. 研究結果

ATCCの基準株とBD患者由来の菌株の中では、BD患者由来の113-20の細胞成分(Lysate)に対するIgA抗体価がもっとも高かった(図1)。また113-20と114-23に対する抗体価は他の抗原に対する抗体価と比べ有意($p<0.05$)に高かった。Western Blotにより、抗体価の高いBD患者の血清が共通して反応する30kDa~40kDaの抗原を認められた(図2矢印)。この抗原は、アミノ酸シーケンスの結果、菌の解糖系の酵素であるピルビン酸キナーゼであることが判明した。

培養細胞(NOMO1)に7種類の菌の培養上清硫酸分画と細胞成分(Lysate)を作用させた(113-20-Lysateは硫酸分画も使用)。培養上清硫酸分画では、IL8、TNFともに誘導活性が無かった。IL8は*pyogenes*以外の菌体成分?抗原で強く誘導された(図3)。またTNFも同様の結果だった(図4)。

D. 考察

BD患者のIgA反応した113-20株のピルビン酸キナーゼは、解糖系の酵素であり、細菌や真核細胞に広く分布する蛋白質である。なぜ113-20株の蛋白が、BD患者に対して強い抗原性を持つのか不明である。しかし、今後この蛋白を精製し、BD患者の特徴である細菌抗原に対する過敏症の指標にならない

いか、また診断に応用できないか検討していきたい。

単球系培養細胞からのサイトカインの誘導では、113-20株と基準株の差は無かったが、菌体成分によりIL8やTNFの産生が誘導された。また以前の報告で、113-20株による患者の単核球からのIL8産生は、他の菌に比べ高い傾向であった。今後この系を用いて、113-20株のどのような成分がサイトカイン誘導にかかわっているのか同定していきたい。また共同実験者の研究結果によると、以前にわれわれが作製した熱ショック蛋白(HSP60)の合成ペプチドが、患者リンパ球からのサイトカイン産生を抑えるとの報告もあり、この系を用いて、その機構の解明も検討していきたい。

E. 結論

BD患者の病理と密接にかかわっていると考えられる口腔内の連鎖球菌と患者の細菌抗原に対する過敏症との関係を検討した。BD患者由来113-20株を抗原として、患者IgAの上昇、培養細胞からのサイトカインの上昇を認めた。今後この反応にかかわる細菌抗原を同定し、診断、治療に応用できないか検討していきたい。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kurauchi T, Yokota K, Matsuo T, Fujinami Y, Isogai E, Isogai H, Ohtsuki H, and Oguma, K: Neutrophil and lymphocyte responses to oral streptococcus in Adamantiades-Behcet's disease. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 43, 125-131, 2005.
2. Isogai E, Hirata M, Isogai H, Matsuo K, Miura H, and Oguma K: Antimicrobial and lipopolysaccharide-binding activities of C-terminal domain of human CAP18 peptides to genus Leptospira. J. Applied. Res. 4, 180-185, 2004.

2. 学会発表

なし

H. 知的所得権の取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得
特記事項なし
2. 実用新案登録
特記事項なし
3. その他

図1 各口腔内細菌抗原に対するBD患者IgA抗体価

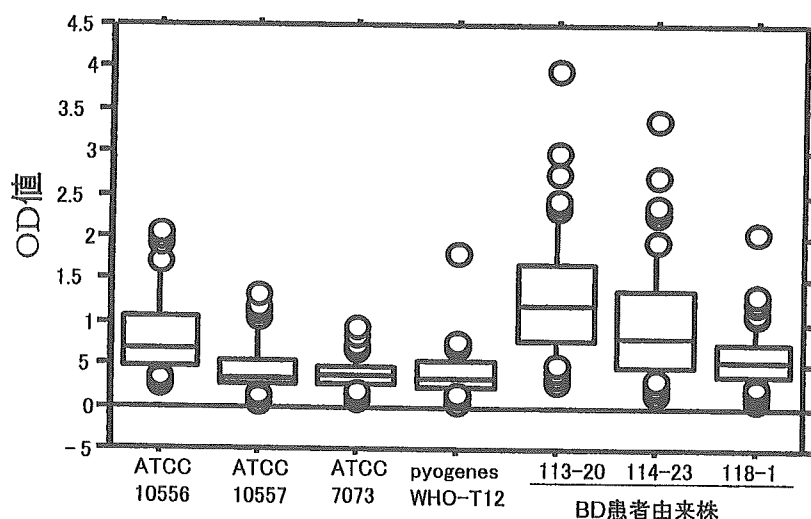


図2 113-20抗原 (Lysate)に対するウェスタンブロット

抗体価の高いBD患者
(N=5)

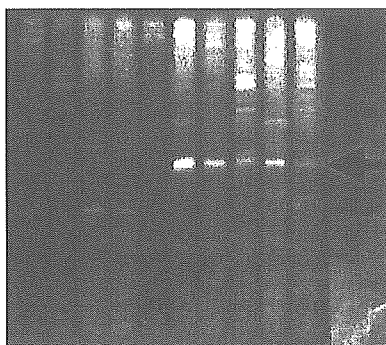


図3 菌体細胞成分刺激によるNOMO1細胞からのIL8の産生

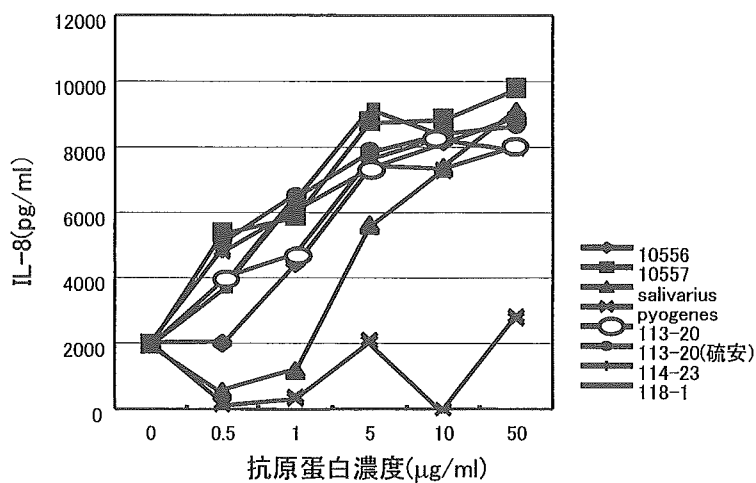
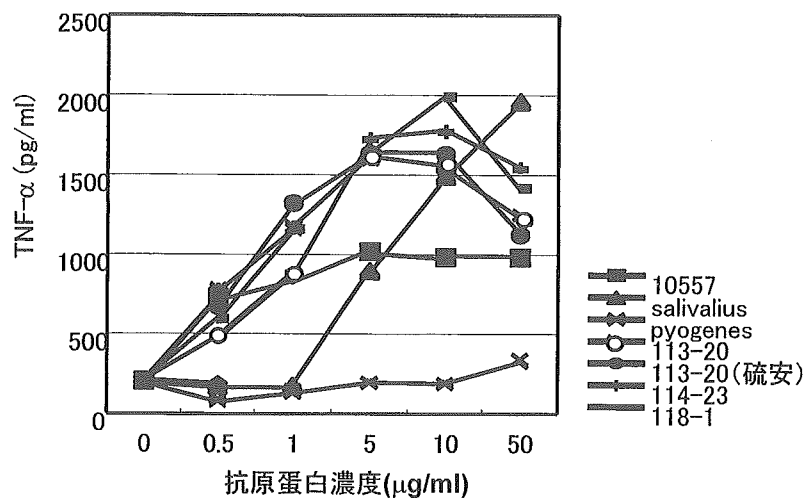


図4 菌体細胞成分刺激によるNOMO1細胞からのTNF-αの産生



厚生科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

ベーチェット病における IL-12B プロモーター領域の多型解析と
Streptococcus Sanguinis に対する反応性

分担研究者	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
	岡田智子	福島県立医科大学 皮膚科学講座
	尾山徳孝	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
	西田朋美	横浜市立大学 医学部眼科
	水木信久	横浜市立大学 医学部眼科

研究要旨 ベーチェット病 (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が、その病因については明らかにされていない。今回我々は IL12 p 40 プロモーター領域の遺伝子多型について解析と、それぞれのゲノタイプにおける LPS、あるいは *Streptococcus sanguinis* (*S. sanguinis*) の反応性を解析した。これまで、IL-12B プロモーター領域に 4bp の挿入がヘテロ接合体で存在すると、IL12p40 の産生量が減少すると報告されている。今回の研究では BD 患者 92 名、健常人 102 名より genomic DNA を抽出し IL12 p 40 プロモーター領域を PCR にて増幅した後、電気泳動にて 4 bp 挿入の有無を確認したところ、ヘテロ群では BD 患者 53.3%、健常人 38.2% ホモ群では BD 患者 46.7%、健常人 61.8% で、BD 群で有意にヘテロの増加を認めた。さらに、IL12 p 40、p 70 の産生量を比較するため、BD 患者と健常人の末梢血単核球を分離し、LPS または *S. Sanguinis* の菌体タンパクと培養し ELISA 法と半定量的 RT-PCR 法にて濃度を比較検討したところ、BD 群のうちヘテロ群で、健常人群、BD ホモ群と比較して、*S. Sanguinis* 菌体タンパクと強い反応性を認めた。

- 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 γ 、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)。これまで我々は、IL12 p 40 untranslated region (UTR) の SNP 解析を行ない BD 群と健常人群で有意差を得なかった。また、今までの報告では IL12 p 40 プロモーター領域に 4 bp 塩基の挿入がヘテロでみられると IL12 の産生量が低下するとの報告があり、喘息²や乾癬³については解析が行なわれているものの、BD ではいまだ解析されていない。
- 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 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 プロモーター領域の多型解析 (図 2)、を行った。また、それぞれの genotype ごとのリポポリサッカライド (LPS)、あるいは *S. Sanguinis* 抗原との反応性を調べた。
- C. 方法： BD 患者 92 名、正常人 102 名より genomic DNA を抽出し IL12 p 40 プロモーター領域を PCR にて増幅した後、電気泳動にて 4 bp 挿入の有無を確認し (図 3)、これらの結果を、HLA-B51 の有無、病型で分別して統計学的に解析を行なった。次に、BD 患者 (n=8) と健常人 (n=9) の末梢血単核球 (PBMC) を分

離し、LPS または S.Sanguinis の菌体タンパクと 1,5,7 日間培養した後、培養上清中の IL12p40、p70 を ELISA 法で測定した。また PBMC から mRNA を抽出し半定量的 RT-PCR 法にて濃度を比較検討した (図 4)。

D. 結果 : BD 患者で 4 bp 挿入 homo:42(48.3%),hetero45(51.7%), 健常人コントロールでは homo 63 (61.8%),hetero 39(38.2%)で($p=0.036$)、さらに HLA-B51 の有無で分けみると BD においては HLA-B51+ /homo30 例、HLA-B51- /homo12 例、HLA-B51+ /hetero19 例、HLA-B51- /hetero 26 例であり、これらの結果を Fisher's exact test で統計処理したところ、有意差を認めた (図 5)。また genotype ごとの S.Sanguinis 抗原との反応性ではヘテロ接合体を持つ BD 群で有意に IL12p40、p70 の産生量が他の群と比較し増加していた (図 6)。一方 LPS 刺激群ではそれぞれの群間において有意差を認めなかった。半定量的 RT-PCR 法においても S.Sanguinis 抗原刺激下で、ヘテロ接合体を持つ BD 群の IL12p40mRNA 発現量増加を認めた (図 7)。

E. 考按 : 今回の研究では IL-12 p40 プロモーター領域において BD 群と健常人群で有意差を認めた。さらに IL-12p40 プロモーターのヘテロ群において、S.Sanguinis 刺激下で IL12p40,p70 の産生量増加を認め、BD における Th1 型優位な免疫反応には IL-12p40 プロモーターの遺伝子多型を背景とした常在細菌抗原に対する免疫応答が関与していることが示唆された。

F. 研究発表 :

Yanagihori H,Oyama N,Nakamura K, Mizuki N,Oguma K,Kaneko F. Role of IL12B promoter polymorphism in Adamantiades-Behcet's disease susceptibility: an involvement of Th1 immunoreactivity against Streptococcus Sanguinis antigen. J Invest Dermatol (in

press)

G. 参考文献 :

- 1) 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 Apr; 34 (2):112-4.
- 2) Morahan G, Huang D, Wu M, Holt BJ, White GP, Kendall GE, Sly PD, Holt PG. Association of IL12B promoter polymorphism with severity of atopic and non-atopic asthma in children. Lancet. 2002 Aug 10;360 (9331):455-9.
- 3) Litjens NH, van der Plas MJ, Ravensbergen B, Numan-Ruberg SC, et al. Psoriasis is not associated with IL-12p70/IL-12p40 production and IL12B promoter polymorphism. J Invest Dermatol. 2004 Apr;122 (4):923-6.

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 プロモーター領域多型領域についての説明
- 図 3.方法 : PCR プライマー配列と電気泳動結果。ヘテロではバンドを 2 本認め、ホモ (++) では上方に 1 本、ホモ (--) では下方に 1 本のバンドを認める。
- 図 4.方法 : IL12p40,p70 の産生量の測定方法
- 図 5.結果 : BD 群と正常人群で有意差を認める。
- 図 6.結果 : S.Sanguinis 抗原刺激下で、ヘテロ接合体を持つ BD 群で有意に IL12p40、p70 の産生量が他の群と比較し増加している。
- 図 7.結果 : S.Sanguinis 抗原刺激下で、ヘテロ接合体を持つ BD 群で有意に IL12p40、p70 の mRNA 発現量が他の群と比較し増加している。

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
Frassanoto 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
Raziuddin S et al. J Rheumatol (1998)

結 果

図 5

IL12p40 promoter

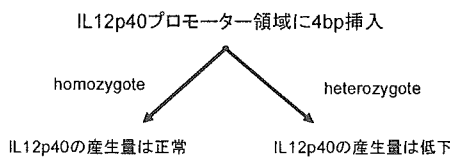
Genotype	BD(n=92)			Control(n=102)		
	HLA-B51 +	HLA-B51 -	Total	HLA-B51 +	HLA-B51 -	Total
Homo (+ + or - -)	30	13	43 (46.7)	10	53	63 (61.8)
Hetero (+/-)	20	29	49 (53.3)	3	36	39 (38.2)

p=0.036

Genotype	BD(n=92)	Control(n=102)
+ +	13(14.1)	19(18.6)
+ -	49(53.3)	39(38.2)
- -	30(32.6)	44(43.1)

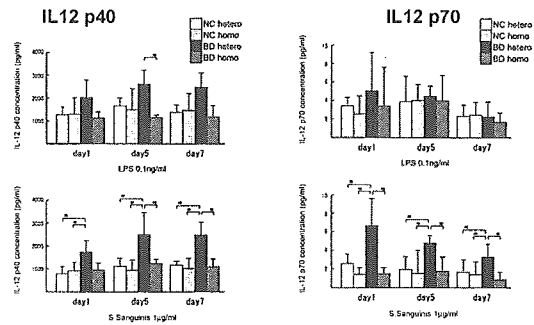
p>0.05
The numbers in parentheses indicate the percentage

IL-12 p40 promoter領域についての報告 図 2



結 果

図 6

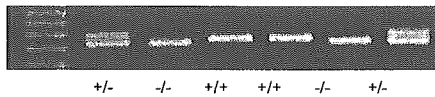


方 法

図 3

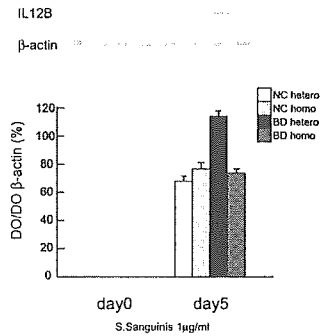
•Behcet病患者群と正常人群からの末梢血からgenomic DNAを抽出しPCRで増幅した後、電気泳動にて4塩基の挿入があるか確認する。

sense primer
5'-TCAGACACATTAACCTTGCA-3'
anti-sense primer
5'-AGGTTCTAATGTGGTCATTG-3'



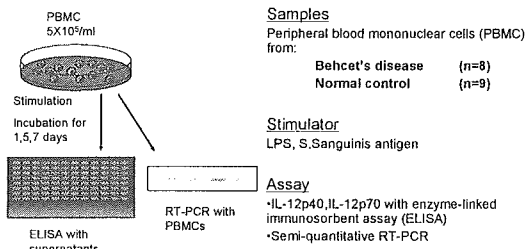
結 果

図 7



方 法

図 4



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変局所における免疫異常及び炎症病態の解析

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
研究協力者 奈良 和彦¹⁾、黒川 真奈絵¹⁾、吉川 英志¹⁾、野中 信宏²⁾、
池島 秀明²⁾、松田 隆秀²⁾、金子 栄³⁾、森田 栄伸³⁾

¹⁾聖マリアンナ医科大学免疫学・病害動物学、²⁾同内科、³⁾島根大学医学部皮膚科

研究要旨

ベーチェット病の皮膚病変部で、Th1 型サイトカイン・ケモカイン、炎症性サイトカイン、及びそれらの受容体の発現亢進を認めた。皮膚及び腸管病変部では TLR2、TLR4 と HSP60 の発現亢進を認め、これらを介した刺激が Th1 優位の免疫異常を惹起する可能性が示された。神経ベーチェット病において、脳脊髄液中の炎症性サイトカインは高値を示し病勢と相関していた。これらの免疫異常及び炎症病態が、ベーチェット病の疾患形成に関与していると考えられる。

A. 研究目的

これまでにベーチェット病(BD)の腸管病変部で Th1 優位の免疫異常が起きており病態形成に関与している可能性を報告した。新たに皮膚病変部における Th バランス、皮膚・脳脊髄液中の炎症性サイトカイン、皮膚・腸管病変部で特異的に発現する TLR 分子を解析し、各病変部に普遍的または特異的な病態機構を明らかにする。

B. 研究方法

BD の皮膚病変部と末梢血、対照疾患の正常部皮膚と末梢血のペア検体より、RT-PCR にてサイトカイン、ケモカインとその受容体、HSP60、TLR の発現を検討した。腸管 BD 及び対照としてクローン病の病変部組織にて、RT-PCR 及び免疫染色により TLR の発現と発現細胞の同定を行なった。また神経 BD 及び対照疾患の脳脊髄液と血清のペア検体で、炎症性サイトカインおよび抗 HSP60 抗体の濃度を ELISA にて測定した。検体は十分な説明の後、同意を取得し採取した。

C. 研究結果

BD の皮膚病変部では IFN γ 、CCR5、MIP-1 β 、IL-12、IL-12 受容体、TNF α 、TLR2、TLR4 の発現が見られ、腸管病変部と同様 Th1 優位の免疫応答が起きていると考えられた。上記

分子の発現は正常部皮膚では認めなかった。HSP60 および MIP-1 α は、BD 及び正常部皮膚の両方で発現していた。BD の腸管病変部では TLR2、TLR4 及び HSP60 の発現を認めたが、クローン病では TLR2 の発現は認めなかった。BD の腸管病変部では CD68 陽性マクロファージが TLR2 を発現しており、HSP60 陽性細胞と近接していた。神経 BD の脳脊髄液及び血清では、IL-6 及び TNF α が病勢と相関して変動し、IL-6 は活動期 BD の脳脊髄液で有為に高値であった。抗 HSP 抗体は、神経 BD の血清中で脳脊髄液中より高値で一定であった。IFN γ は検討した血清・脳脊髄液の全てで検出されなかった。

D. 考察

我々は BD の皮膚・腸管病変部における HSP60 の過剰発現を示してきた。これは感染や炎症の継続によるストレス性病態の存在を示すが、HSP は種間の相同性が高く、BD が特定の病変部で繰り返し症状の増悪を示すことを考えると、微生物の感染による交差反応を契機とした自己免疫応答の遷延化が、病態形成に深く関与していることが示唆される。近年 HSP60 は TLR2/4 のリガンドの 1 つと考えられており、自然免疫系において HSP60 は単球/マクロファージ上の TLR2/4 を刺激し、続いて獲得免疫系を活性化させる

ことが考えられる。即ち単球/マクロファージが IL-12 を産生し、これが IL-12 受容体を発現した T 細胞を Th1 細胞へと分化させ、IFN γ を産生させる。同時にこの Th1 細胞は CCR5 を発現し、MIP-1 β 及び MIP-1 α を認識し炎症部位に遊走すると考えられる。興味深いことに、これまでの成績で皮膚・腸管病変部とも TLR2 は BD のみで発現しており、TLR2 からの刺激伝達が BD に特異的であることが示唆された。TLR からの刺激伝達を遮断することにより、疾患特異的な治療法を確立できる可能性がある。神経 BD の脳脊髄液からは IFN γ は検出されず、TNF α 及び IL-6 といった炎症性サイトカインが認められ、病変部による病態形成機序の差異が示唆された。TNF α の発現は各病変部に共通であったが、特に獲得免疫系の作用が少ないと考えられる神経 BD に対し、抗 TNF 療法の効果が期待できる。

E. 結論

BD では HSP60 の過剰発現が TLR2/4 を介し Th1 優位の免疫異常及び炎症病態を惹起すると考えられ、抗 TNF 療法または上記 TLR 分子を標的とした新規治療法の確立が、疾患の制御に有効であると考えられた。

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) Chiba S, Kurokawa MS, Yoshikawa H, Ikeda R, 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. *Exp Brain Res*, 163:86-99, 2005.
- 2) Kitagawa A, Nakayama T, Takenaga M, Matsumoto K, Tokura Y, Ohta Y, Ichinohe M, Yamaguchi Y, Suzuki N, Okano H, Igarashi R : Lecithinized brain-derived neurotrophic factor promotes the differentiation of embryonic stemcells *in vitro* and *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun*, 328(4):1051-1057, 2005.

- 3) Chiba S, Kurokawa MS, Yoshikawa H, Ikeda R, 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. *Exp Brain Res*, 163:86-99, 2005.
- 4) Ikeda R, Kurokawa MS, Chiba S, Yoshikawa H, Ide M, Tadokoro M, Nito S, Nakatsuji N, Kondoh Y, Nagata K, Hashimoto T, Suzuki N: Transplantation of neural cells derived from retinoic acid-treated cynomolgus monkey embryonic stemcells successfully improved motor function of hemiplegic mice with experimental brain injury. *Neurobiology of Disease*, 20(1):38-48, 2005.
- 5) Ide M, Ueda Y, Watanabe K, Kurokawa MS, Yoshikawa H, Sakakibara M, Hashimoto T, Suzuki N: Characterization of intracellular free Ca²⁺ movements in neural progenitor cells derived from ES cells transfected with MASH1 transcription factor gene. *Inflammation and Regeneration*, 25(5):452-460, 2005.
- 6) Suzuki N, Nara K, Suzuki T: Skewed Th1 responses caused by excessive expression of Txk, a member of Tec family tyrosine kinases in patients with Behcet's disease. *Clinical Medicine and Research*, in press, 2005.
- 7) 鈴木登、鈴木知子. ベーチェット病と Toll-like receptor. *医学のあゆみ*, 215(1):23-27, 2005 .
- 8) Suzuki N, Nara K, Suzuki T: Skewed Th1 responses caused by excessive expression of Txk, a member of Tec family tyrosine kinases in patients with Behcet's disease. *Clinical Medicine and Research*, in press, 2005.
- 9) Yoshikawa H, Nara K, Suzuki N: Recent advances in neuro-endocrine-immune interactions in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Current Rheumatology Reviews*, in press, 2005.
- 10) 鈴木登. Th1 細胞動態の up to date Th1 細胞特異的な Tec family チロシン酸化酵素(Txk)を介した自己免疫

疾患の制御. Surgery Frontier, 12(4):72-74, 2005.

- 11) Sakane T, Suzuki N: Neuro-endocrine-immune axis in human rheumatoid arthritis. Autoimmunity Kluwer Academic Publishers, Wroclaw, Poland, in press, 2005.
- 12) Hamada M, Yoshikawa H, Ueda Y, Kurokawa MS, Watanabe K, Sakakibara M, Akashi K, Aoki H, Suzuki N: Introduction of MASH1 gene into mouse embryonic stem cells leads to differentiation of motoneuron precursors lacking Nogo receptor expression that can be applicable for transplantation to spinal cord injury. Neurobiology of Disease, in press, 2006.

2. 学会発表

- 1) 蒲地宏昌：マウス胚性幹(ES)細胞より IGF II 遺伝子導入で分化誘導した筋系損傷モデルへの移植応用、第4回再生医療学会総会、2005.3.1.
- 2) 阿藤晃一：マウス ES 細胞由来神経堤細胞(neural crest cell)からのメラノサイトの分化誘導、第4回再生医療学会総会、2005.3.2.
- 3) Kurokawa MS, Imamura Y, Yoshikawa H, Nara K, Matsuda T, Suzuki N: Th1 dominant immune response and abnormal expression of heat shock protein 60 are associated with the inflammation of intestinal Behcet's disease. The First East Asian Group of Rheumatology (EAGOR) meeting, 2005.5.28.
- 4) 蒲地宏昌、黒川真奈絵、吉川英志、渡辺憲史、榊原学、青木治人、鈴木登：ES細胞への IGFII 遺伝子導入による筋系細胞の分化誘導—筋損傷及び筋疾患モデルマウスへの移植治療—、第26回日本炎症・再生医学会、2005.7.12.
- 5) 阿藤晃一、吉川英志、黒川真奈絵、熊谷憲夫、鈴木登：マウス胚性幹細胞由来神経堤細胞からのメラノサイトの分化誘導、第26回日本炎症・再生医学会、2005.7.12.
- 6) 尾崎志雲、吉川英志、黒川真奈絵、鈴木登：単核球における炎症性メディエーター発現のニコチンによる抑制、第26回日本炎症・再生医学会、2005.7.12.
- 7) 井手路子、黒川真奈絵、池田律子、吉川英志、今井俊夫、橋本卓雄、鈴木登：胚性幹細胞由来神経前駆細胞による損傷脳の移植治療、第26回日本炎症・再生医学会、2005.7.13.
- 8) 阿藤晃一、黒川真奈絵、吉川英志、鈴木登：マウス胚性幹細胞からの神経堤細胞の分化誘導とメラノサイトへの最終分化、第8回日本組織工学会、2005.9.1-2.
- 9) 陳志雲、吉川英志、黒川真奈絵、鈴木登：単核球に発現されるニコチンアセチルコリン受容体の機能、第35回日本免疫学会、2005.12.13.
- 10) 奈良和彦、黒川真奈絵、吉川英志、金子栄、森田栄伸、松田隆秀、鈴木登：ベーチェット病の病態形成における自然免疫の役割、第35回日本免疫学会、2005.12.14.
- 11) 嘉山真紀、上野宏樹、本間龍介、黒川真奈絵、上野聰樹、鈴木登：pax-6 遺伝子導入によるマウス胚性幹細胞の角膜上皮細胞への分化誘導、第5回日本再生医療学会、2006.3.8-9.
- 12) 上野宏樹、嘉山真紀、本間龍介、黒川真奈絵、上野聰樹、鈴木登：Pax6 遺伝子導入胚性幹(ES)細胞より分化誘導した角膜上皮様細胞の角膜損傷モデルへの移植治療、第5回日本再生医療学会、2006.3.8-9.
- 13) 井手路子、上田裕司、渡辺憲史、黒川真奈絵、吉川英志、榊原学、橋本卓雄、鈴木登：MASH1 遺伝子を導入した胚性幹細胞由来神経前駆細胞での細胞内フリーカルシウムイオンの特性、第5回再生医療学会、2006.3.8-9.
- 14) 奈良和彦、金子栄、黒川真奈絵、吉川英志、鈴木登：ベーチェット病の皮膚病変部における Th1 優位の免疫応答 第50回リウマチ学会、2006.4.23-26.

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

ベーチェット病症例における Toll-like receptor 9 遺伝子変異・多型の検索に関する研究

分担研究者 佐藤由紀夫 福島県立医科大学医学部内科学第二講座 教授
研究協力者 小林 浩子 福島県立医科大学医学部内科学第二講座
関根 英治 福島県立医科大学医学部内科学第二講座
坂本 夏美 福島県立医科大学医学部内科学第二講座
金子 史男 福島県立医科大学医学部皮膚科学講座 教授
尾山 徳孝 福島県立医科大学医学部皮膚科学講座

研究要旨：我々の実験からベーチェット病(BD)症例の Toll like Receptor 9 (TLR9) に何らかの異常または変異がある可能性が推察されており、BD 症例、健常人、および疾患コントロールとして関節リウマチ(RA)症例とにおける TLR9 遺伝子の変異または多型を検出し解析を行ってきた。これまでに TLR9 遺伝子上に検出した 5 個の SNP のうち、比較的頻度が多い SNP (-1486 T/C、1174 A/G、2849 G/A) について BD 症例 39 例、健常人 43 例、RA 症例 36 例の解析を終了した。その結果、BD 症例では健常人と比較して homozygous genotype -1486 CC、1174 GG が有意に多く認められた。一方、BD 症例と RA 症例、RA 症例と健常人とでは genotype における有意差を認めなかった。また、diplotype でも BD 症例では健常人と比較して C-G-A/C-G-A と homozygous な組み合わせが有意に多く認められ、これらの SNP 間には強い連鎖不平衡が認められた。以上より、TLR9 の SNP が BD 症例の発症や病態に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

これまでに我々はベーチェット病 (BD) 症例の末梢血単核球を非メチル化 CpG DNA で刺激し細胞増殖 assay を行うと、健常人のそれと比べて CpG DNA に対する反応性が高まっていることを報告した(平成 15 年度報告済み)。CpG DNA は TLR9 を介して強い免疫活性化作用を示すとされていることから、BD 症例の TLR9 に何らかの異常あるいは変異がある可能性が推察された。また、Rheumatoid factor の産生に TLR9 を介した刺激の関与が報告されたことから、関節リウマチ (RA) においても TLR9 の異常や変異のある可能性が考えられている。そこで我々は BD 症例および健常人に、疾患コントロールとして RA 症例を加え、TLR9 遺伝子の変異または多型を検索しその解析を行った。

B. 研究方法

当施設に通院中または入院中の BD 症例 39 例、RA36 例、健常人 43 例を対象として、今回は TLR9 遺伝子上にあり比較的頻度の高い 3 つの SNP(-1486 T/C, 1174 A/G, 2849

G/A) を中心に多型の検出を行った。具体的には以下の手順に従って解析を行った。

- 1) 対象例の末梢血単核球を分離し、genomic DNA を抽出。
- 2) PCR 法にて TLR9 genomic DNA 断片を増幅。
- 3) Direct sequence 法にて塩基配列を解読。
- 4) BD または RA 症例と健常人、BD 症例と RA 症例、およびデータベース上の塩基配列とを比較検討。

(倫理面への配慮)

当研究は、当大学の倫理委員会の承認を得、検体および情報の取り扱いについては倫理委員会の定める規定に従った。

C. 研究結果

前回報告した 5 つの SNP のうち、今回は比較的高いアレル頻度を認めた -1486:T/C, 1174:A/G, 2849:G/A の 3 つの SNP について解析を進めた (図 1)。それぞれのアレル頻

度に、BD 症例、RA 症例、健常人いずれのグループ間においても統計学有意差は認めなかった (表 1)。Genotype の解析では BD 症例で homozygous -1486CC, 1174GG が多く認められたが、健常人では heterozygous -1486CT, 1174GA が多く認められ統計学的有意差を認めた。2849:A/G についても同様の傾向が認められたが、統計学的有意差は認められなかった。また、BD 症例、健常人ともに RA 症例との比較では genotype において統計学的有意差を認めなかった (表 2)。EM アルゴリズムを用いて行った diplotype の推定でも BD 症例では C-G-A/C-G-A と homozygote を多く認めたのに対し、健常人と RA 症例では C-G-A/T-A-G の heterozygote が多く、BD 症例と健常人間で統計学的有意差を認めた (表 3)。

D. 考案

今回の検討で BD 症例と健常人との間で TLR9 の SNP の genotype、diplotype それぞれで統計学的有意差を認めたことから今回検討した 3 つの SNP (-1486:T/C, 1174:A/G, 2849:G/A) のいずれか、または複数が BD の病因・病態に関与している可能性が示唆された。しかし、これらの SNP と連鎖している未知の変異・多型が存在し、それが疾患と関連している可能性も否定はできないと考えられた。RA 症例の結果は健常人との比較で統計学的有意差を認めなかったが、比較的 BD 症例のそれと似た傾向を示しており、これらの TLR9 の SNP が他の自己免疫疾患と関連している可能性も示唆された。

E. 結論

TLR9 の SNP を解析した結果、BD 症例において -1486CC, 1174GG, 2849AA が多く、また、これらの SNP において C-G-A/C-G-A と homozygote が多く認められ、健常人との比較で統計学的有意差を認めた。これらの結果からこれらの TLR9 の SNP が BD の病因・病態に関与している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kazumichi Abe, Hiromasa Ohira, Hiroko Kobayashi, Tsuyoshi Rai, Hironobu Saito, Atsushi Takahashi, Yukio Sato: Role of CpG ODN in concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Fukushima J Med Sci* 2005, 51: 41-49.
2. 小林 浩子、佐藤 由紀夫: TLR9 を標的とした実験的関節炎の抑制 *臨床免疫* 2005, 44: 276-280.
3. Takuto Hikichi, Hiroko Kobayashi, Hitoshi Oyama, Go Yamamoto, Hiroshi Watanabe, Atushi Irisawa, Katutoshi Obara, Yukio Sato: Effectiveness of intragastric immunization with protein and oligodeoxynucleotides containing a CpG motif for inducing a gastrointestinal mucosal immune response in mice. *Fukushima J Med Sci* 2005, 51: 19-31.
4. 小林 浩子、佐藤 由紀夫: CpG モチーフによる Th1/Th2 反応の制御 *Surgery Frontier* 2005, 12: 383-385.
5. 小林 浩子、佐藤 由紀夫: 遺伝子診療学- 遺伝子診断の進歩と遺伝子治療の展望- 遺伝子治療- 現状と展望- 膠原病・アレルギー疾患に対する遺伝子治療- 関節リウマチ *日本臨床* 2005, 63, Suppl 12: 655-658.

2. 学会発表

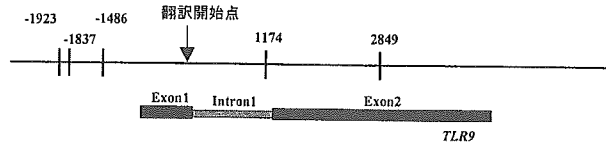
小林浩子、深谷悦子、佐藤由紀夫; ベーチェット病患者末梢血単核球の微生物由来 DNA に対する反応性、第 55 回日本アレルギー学会総会

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

検出されたTLR9のSNP

図1



検出されたTLR9のSNPのアリル頻度

表1

	allele	BD	control	RA	dbSNP	JSNP
-1923	C/A	0.980 / 0.020	0.951 / 0.049	未検索	0.984 / 0.016	(登録なし)
-1837	C/T	0.900 / 0.100	0.951 / 0.049	未検索	頻度不明	頻度不明
-1486	T/C	0.434 / 0.564	0.477 / 0.523	0.431 / 0.569	0.617 / 0.383	(登録なし)
1174	A/G	0.434 / 0.564	0.488 / 0.512	0.431 / 0.569	0.512 / 0.488	0.5167 / 0.4833
2849	G/A	0.434 / 0.564	0.523 / 0.477	0.431 / 0.569	0.481 / 0.519	0.5167 / 0.4833

Genotype解析結果

表2

	-1486	N	1174	N	2849	N
BD (N=39)	CC	15 (0.385)*	GG	15 (0.385) †	AA	15 (0.385)
	CT	14 (0.359)*	GA	14 (0.359) †	AG	14 (0.359)
	TT	10 (0.256)*	AA	10 (0.256) †	GG	10 (0.256)
Control (N=43)	CC	9 (0.209)*	GG	8 (0.186) †	AA	8 (0.186)
	CT	27 (0.628)*	GA	28 (0.651) †	AG	25 (0.581)
	TT	7 (0.163)*	AA	7 (0.163) †	GG	10 (0.234)
RA (N=36)	CC	13 (0.361)	GG	13 (0.361)	AA	13 (0.361)
	CT	15 (0.417)	GA	15 (0.417)	AG	15 (0.417)
	TT	8 (0.222)	AA	8 (0.222)	GG	8 (0.222)

* P = 0.048 (BD vs Control) † P = 0.027 (BD vs Control)

Diplotype推定結果

表3

	Haplotype 1	Haplotype 2	N	Frequency
BD	C G A	C G A	15 / 39*	0.385
	C G A	T A G	14 / 39*	0.359
	T A G	T A G	10 / 39*	0.256
Control	C G A	T A G	24 / 43*	0.545
	C G A	C G A	8 / 43*	0.212
	T A G	T A G	7 / 43*	0.152
	T A G	C A G	3 / 43*	0.061
	C G A	C G G	1 / 43*	0.030
RA	C G A	T A G	15 / 36	0.417
	C G A	C G A	13 / 36	0.361
	T A G	T A G	8 / 36	0.222

* P = 0.041 (BD vs Control)

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 NKG2D 発現リンパ球の活性化レベルの検討

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 山口由衣 横浜市立大学皮膚科 大学院生
高橋一夫 横浜市立大学皮膚科 準教授
池澤善郎 横浜市立大学皮膚科 教授
水木信久 横浜市立大学医学部眼科教授

研究要旨

ベーチェット病(BD)は、急性炎症を繰り返す難治性炎症性疾患で、その発症には先天性素因と環境因子が関与する。本病の感受性遺伝子として報告された MICA は、粘膜上皮、血管内皮、表皮など BD 病変部に一致した発現パターンを示し、その発現はストレス依存性である。MICA 分子は、NK 細胞、CD8⁺T 細胞、 γ δ T 細胞が発現する NKG2D のリガンドであり、その結合シグナルは細胞障害活性を増強する。そこで、今回我々は、MICA を介した免疫応答が BD の病変形成に関与する可能性を検証するため、BD 患者末梢血中の NKG2D 発現リンパ球の活性化状態を検討した。対象は BD 患者 18 例（活動期 7 例、非活動期 11 例）、健常人 9 例。末梢血単核球を用いて CD8⁺、CD3⁻CD56⁺、pan- γ δ ⁺細胞における NKG2D および活性化マーカー CD69 の発現を多重染色によるフローサイトメトリーにより解析した。CD8⁺T 細胞、NK 細胞、 γ δ T 細胞における NKG2D 発現比率は活動期 BD、非活動期 BD、健常人で差がなかったが、NKG2D 発現細胞における CD69 発現レベルが活動期 BD において、非活動期 BD、健常人に比べて有意に高かった。活動期 BD 患者末梢血において NKG2D 発現細胞傷害性リンパ球全般が活性化されていることは、MICA を介した免疫応答が BD の病変形成に重要な役割を果たす可能性を示唆する。

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であるが、その病態はいまだ明らかでない。本病の疾患感受性遺伝子として HLA-B51 は有名であるが、近年、HLA-B 遺伝子座近傍のマイクロサテライト解析により、BD 感受性遺伝子として HLA クラス I 類似分子の MICA 遺伝子が同定された。アラニン残基を 6 つ有する A6 多型をもつ MICA*009 アレルが BD 患者で健常人に比べて有意に高率に検出される¹⁾。MICA プロモーター領域には熱ショック配列が存在し、その発現はストレスにより誘導される²⁾。MICA 遺伝子発現は粘膜上皮細胞、表皮細胞、血管内皮細胞などに限定され、BD 病変部に一致することから MICA 分子が BD の病変形成に関与する可能性が想定されてきた。その機序の一つとして、我々は、HLA-B51 拘束性の MICA 反応性 CD8

⁺T 細胞が、活動期 BD 患者にのみ検出されることを報告し³⁾、MICA 発現細胞が CD8⁺細胞傷害性 T 細胞の標的となる可能性を示唆した。

MICA 分子は主に腸管上皮に存在する V δ 1⁺の γ δ T 細胞レセプターのリガンドであることが報告されたが⁴⁾、その後、細胞傷害活性を持つリンパ球に発現される killer activating receptor の 1 つ NKG2D のリガンドにもなりうることを示された⁵⁾。NKG2D はほぼ全ての NK 細胞、CD8⁺T 細胞、 γ δ T 細胞に発現され、MICA との結合シグナルにより細胞傷害活性を増強する⁵⁾。そこで、今回我々は、末梢血リンパ球における NKG2D 発現細胞の活性化状態を調べることで、MICA 分子が BD の病変形成に寄与する可能性を検討した。

B. 研究方法

1. 対象

厚生労働省研究班の診断基準を満たすベーチェット病18例。活動性眼病変、神経症状・腸管症状、入院を要する陰部潰瘍や血栓性静脈炎を有する患者を活動期(n=7)、それらを持たない症例を非活動期(n=11)とした。またコントロールとして健常人9例を用いた。

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(PBMC)をCD3、CD4、CD8、CD56、CD69、pan- $\gamma\delta$ T細胞レセプター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。CD69発現レベルは、アイソタイプを一致させたコントロール抗体による蛍光輝度(mean fluorescence intensity : MFI)に対する比として表した。

3. 統計学的解析

活動期BD、非活動期BD、健常人の3群についてそれぞれ各群間の差をMann-Whitney U-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

まず末梢血CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、NK細胞(CD3⁺CD56⁺)、 $\gamma\delta$ T細胞におけるNKG2D発現細胞の比率を、活動期BD、非活動期BD、健常人の3群間で比較した(図1)。CD4⁺T細胞におけるNKG2D発現細胞は3群のいずれにおいても5%未満と少なく、その比率に差もないことから以後の検討から除外した。一方、CD8⁺T細胞、NK細胞、 $\gamma\delta$ T細胞は高率(>80%)にNKG2Dを発現し、その比率は3群間で差を認めなかった。

次にCD8⁺T細胞、NK細胞、 $\gamma\delta$ T細胞における活性化マーカーCD69の発現レベルについて3群間で比較した(図2)。CD8⁺T細胞、NK細胞、 $\gamma\delta$ T細胞におけるCD69の発現レベルは、活動期BDで、非活動期BD、健常人に比べて有意に高値であった。一方、非活動期BDと健常人の間に有意差はなかった。

さらに、CD69発現レベルをNKG2D⁺CD8⁺T細胞、NKG2D⁺NK細胞、NKG2D⁺ $\gamma\delta$ T細胞に限定して比較した(図

3)。CD69の発現は、活動期BDで、非活動期BD、健常人と比較して有意に高く、その傾向はNKG2D⁺ $\gamma\delta$ T細胞に顕著であった。また、NKG2D⁺ $\gamma\delta$ T細胞におけるCD69発現レベルは、非活動期BDで健常人に比較して有意に高かったが、NKG2D⁺CD8⁺T細胞、NKG2D⁺NK細胞におけるCD69発現レベルは非活動期BDと健常人の間に差を認めなかった。

D. 考察

今回の検討から、リンパ球におけるNKG2D発現細胞の比率はBD患者と健常人で差はないが、活動期BDにおいて、NKG2Dを発現するリンパ球(CD8⁺T細胞、NK細胞、 $\gamma\delta$ T細胞)の活性化レベルが高いことが明らかとなった。一方、非活動期BDと健常人の比較では、活性化状態に差を認めたのは $\gamma\delta$ T細胞のみであった。

MICA分子はストレスや細胞傷害に依存して粘膜上皮・血管内皮・表皮などBD病変部に一致して発現される。ほとんどのCD8⁺T細胞、NK細胞、 $\gamma\delta$ T細胞はNKG2Dを発現し、ストレスや傷害を受けた細胞上に発現誘導されたMICAを目印として、それらを除去する機構を担っている。活動期BD患者末梢血に活性化したNKG2D発現細胞傷害性リンパ球が多く存在していたことは、ストレスなどで上皮や血管内皮にMICAが発現誘導されれば、これら活性化リンパ球が血管外へと容易に遊走し、MICA発現細胞を標的とした免疫応答が誘導されることを示唆する。すなわち、活動期BDでは外部からのストレスに対してMICAを介した免疫応答が増強している可能性がある。この点は、BD患者における口内炎、結節性紅斑、眼症状など臨床症状の悪化が細菌・ウイルス感染などの様々なストレス環境下で誘導されることが多い臨床観察と一致する。活動期BDでは、MICA反応性CD8⁺T細胞が検出されることも相まって、BDの病態形成がMICAを標的とした過剰な免疫応答として説明できる可能性がある。この仮説については今後のさらなる検証が必要であるが、BD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

活動期 BD 患者末梢血には活性化した NKG2D 発現 CD8⁺T 細胞、NK 細胞、 γ δ T 細胞が増加していた。BD の病変形成において、これら活性化細胞傷害性リンパ球による MICA を介した免疫応答の増強が関与する可能性が示唆された。

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) Mizuki N et al. PNAS 1997;94:1298
- 2) Groh et al. PNAS 1996;93:12445
- 3) Yasuoka H et al, Arthritis Rheum 2004;50:3658
- 4) Groh V et al. Science 1998;279:1737

- 5) Bauer S et al. Science 1999;285:727
- 6) Groh V et al. Nat Immunol 2001;2:255
- 7) Richie Ehrlich LI et al. J.Immunol 2005;174:1922
- 8) Wu J et al. Science 1999;285:730
- 9) Wu J et al. J.Immunol 2002;169:1236
- 10) Maasho K et al. J.Immunol 2005;174:4480
- 11) Markiewicz MA et al. J.Immunol 2005;175:2825

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

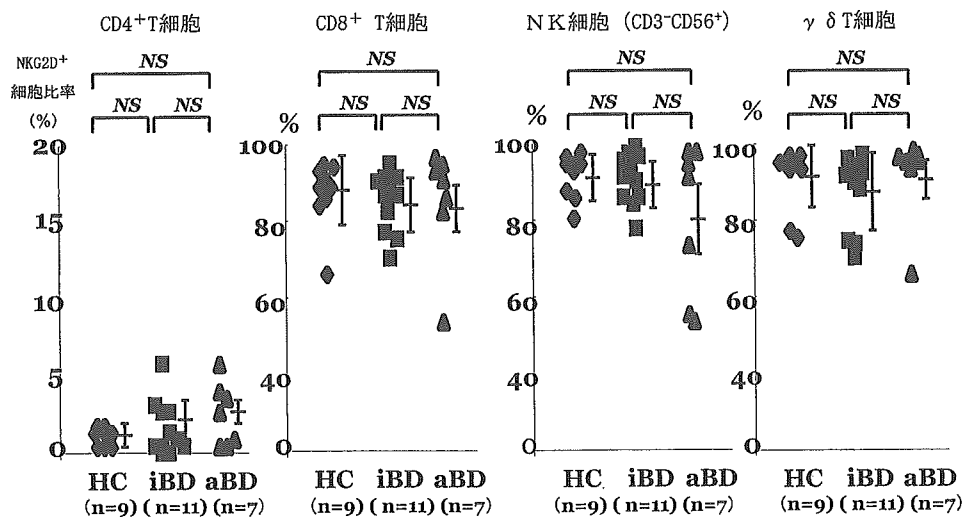


図1 : 健康人(HC)、非活動期BD(iBD)、活動期BD(aBD)におけるCD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、NK細胞、 γ δ T細胞中のNKG2D発現細胞の比率。各群における平均と標準偏差を示す。NS : 有意差なし。

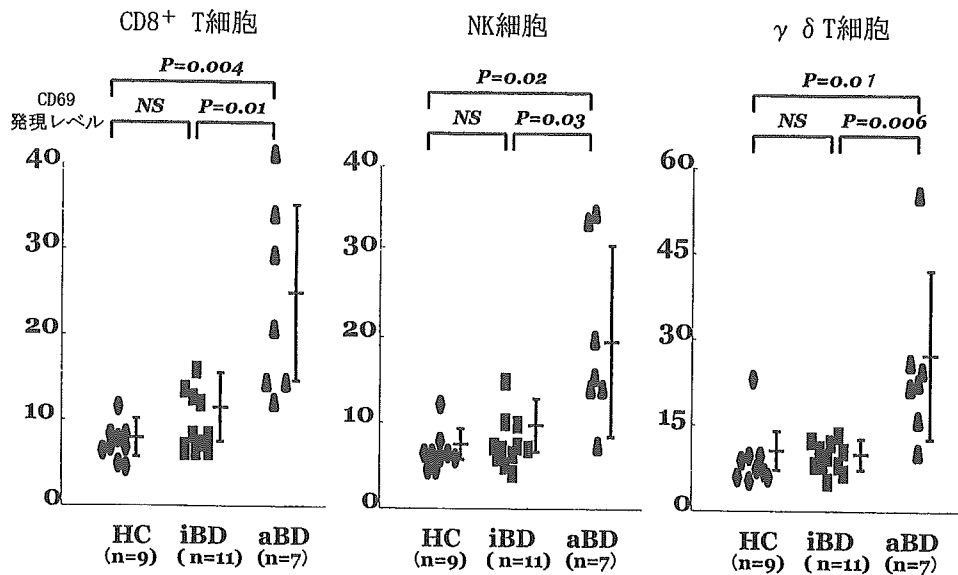


図2：健常人(HC)、非活動期BD(iBD)、活動期BD(aBD)におけるCD8⁺T細胞、NK細胞、γ δ T細胞のCD69発現レベル。各群における平均と標準偏差を示す。NS：有意差なし。

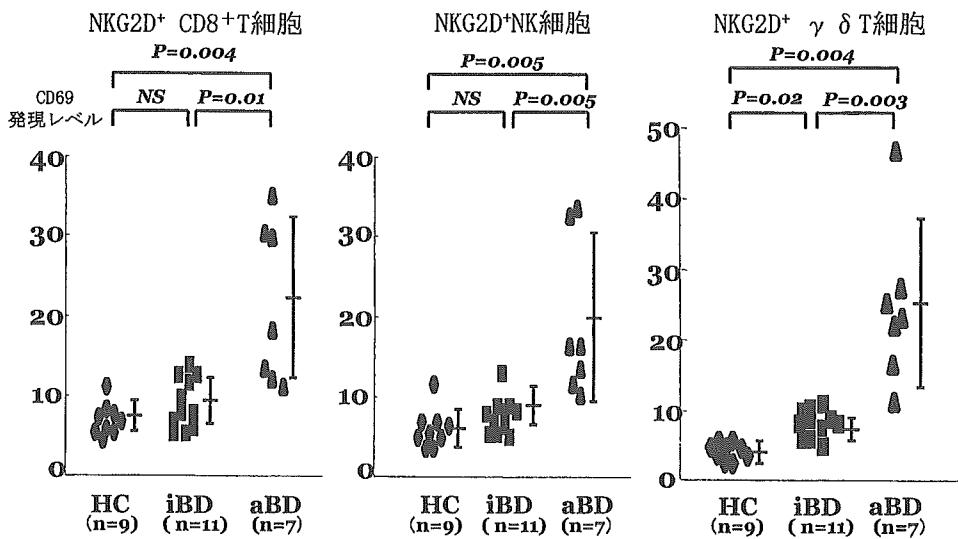


図3：健常人(HC)、非活動期BD(iBD)、活動期BD(aBD)におけるNKG2D発現CD8⁺T細胞、NK細胞、γ δ T細胞のCD69発現レベル。各群における平均と標準偏差を示す。NS：有意差なし。

厚生科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

ベーチェット病の皮膚粘膜病変部における細胞障害性因子と浸潤細胞の検討

分担研究者 岩月啓氏 岡山大学大学院医歯学研究科皮膚・粘膜・結合織学 教授
共同研究者 山崎 修 岡山大学大学院医歯学研究科皮膚・粘膜・結合織学
森實 真 岡山大学大学院医歯学研究科皮膚・粘膜・結合織学
青地聖子 岡山大学大学院医歯学研究科皮膚・粘膜・結合織学
大野貴司 岡山大学大学院医歯学研究科皮膚・粘膜・結合織学

研究要旨： GranulysinはT、NK細胞から放出される細胞障害性因子で病原体などに対し強力な抗菌活性を有するとともに、ウイルス感染細胞や腫瘍細胞のapoptosisを誘導する。我々はベーチェット病の病変形成におけるgranulysin発現リンパ球について研究した。毛嚢炎、口腔内アフタ、外陰部潰瘍にgranulysin陽性細胞を認めたが、結節性紅斑では陽性細胞を認めなかった。GranulysinはCD4及びCD8陽性T細胞に発現がみられた。Granulysin発現T細胞が本症の皮膚粘膜病変形成に関与していると推測した。

A. 研究目的

ベーチェット病の病変部に浸潤する細胞は主に好中球であるが、多数のリンパ球の浸潤も認める。また患者病勢の活動期に変動するCD8、 $\gamma\delta$ T細胞の異常な免疫反応が明らかにされ、細胞障害性T細胞の病因的重要性が示唆されている。GranulysinはT細胞、NK細胞より放出されるタンパクで、細胞傷害性T細胞の活性を示す指標とも考えられている。また細菌、真菌などに対する強力な抗菌活性や抗ウイルス活性についても報告されている。さらにgranzyme Bもgranulysinと同様に細胞傷害性T細胞の活性を示す指標と考えられている。我々は細菌性の毛包炎やウイルス性の水疱において、granulysinの発現を確認し、細胞障害性T細胞の役割について検討してきた。今回ベーチェット病の皮膚粘膜病変形成と、細胞障害性T細胞活性を評価するマーカーとしてのgranulysinの関与についてさらに検討した。

B. 研究方法

ベーチェット病の皮膚・粘膜病変（ざ瘡様発疹・口腔内アフタ・外陰部潰瘍・結節性紅斑におけるgranulysin, granzyme Bの発現を免疫染色法で検討した。また、浸潤するリンパ球の表面マーカー（CD3, CD4, CD8, CD20, CD56）を免疫染色で検討した。

さらにgranulysinを発現している細胞を同定するためgranulysinとリンパ球表面マーカー（CD3, CD4, CD8）をそれぞれピオチン標識二次抗体とFITC標識二次抗体を用いて二重染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

（倫理面への配慮）

完全に匿名化した保全されていた病理標本を用いた。

C. 研究結果

免疫染色では、ざ瘡様発疹、外陰部潰瘍、口腔内アフタにおいてほぼ全例の浸潤細胞にgranulysinが発現していたが、結節性紅斑では発現していなかった。一方、granzyme Bはそれぞれの病変部で発現は認めなかった。

病変部に浸潤するリンパ球は、ざ瘡様発疹、陰部潰瘍、口腔内アフタ、結節性紅斑ではCD4陽性、CD8陽性のリンパ球が主体で、CD20、CD56陽性細胞はほとんど認めなかった。

共焦点レーザー顕微鏡による観察では、ざ瘡様発疹、外陰部潰瘍、口腔内アフタのCD4陽性、CD8陽性T細胞がともにgranulysinを発現していた。

D. 考察

ベーチェット病の皮膚粘膜病変部における浸潤するリンパ球の特徴については、結節

性紅斑様皮疹については詳細に検討され、CD4陽性T細胞が優位であることが報告されている。そのほかの病変については十分検討がされていなかった。今回の検討では、外陰部潰瘍、口腔内アフタ、ざ瘡様発疹ともにCD4およびCD8陽性T細胞の浸潤が主体であった。

Granulysinは強力な抗菌活性以外に腫瘍細胞やウイルス感染細胞のapoptosisを誘導するとも報告されている。我々の行った免疫染色では、ベーチェット病患者のざ瘡様発疹、外陰部潰瘍、口腔内アフタにgranulysinの発現が確認され、細胞障害性因子が病変部形成に関与している可能性が示唆された。しかしながら、結節性紅斑部ではgranulysinの発現は認められなかった。これらの結果は、本症における毛嚢炎や口腔内アフタと外陰部潰瘍の形成には細胞傷害性T細胞が関与しているが、結節性紅斑の形成は組織病因的には異なる機序が働いている可能性を示唆する。

Granzyme BはT細胞やNK細胞のアズール顆粒内に存在する細胞障害因子だが、本症の皮膚粘膜病変では発現されていなかった。

E. 結論

ベーチェット病の毛嚢炎、外陰部潰瘍、口腔内アフタでgranulysin発現するCD4およびCD8陽性細胞を認めた。しかし、結節性紅斑部のリンパ球にはgranulysinの発現は認めなかった。granulysin発現リンパ球（細胞障害性T細胞）が皮膚粘膜病変形成に関与していると推測した。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Oono T, Morizane S, Yamasaki O, Yshirafuji Y, Huh WK, Akiyama H, and Iwatsuki K. Involvement of granulysin-producing T-cells in the development of superficial microbial folliculitis. Br J Dermatol 150: 904-909, 2004.
- 2) Morizane S, Suzuki D, Tsuji K, Oono T, Iwatsuki K: The role of CD4 and CD8 cytotoxic T lymphocytes in the formation

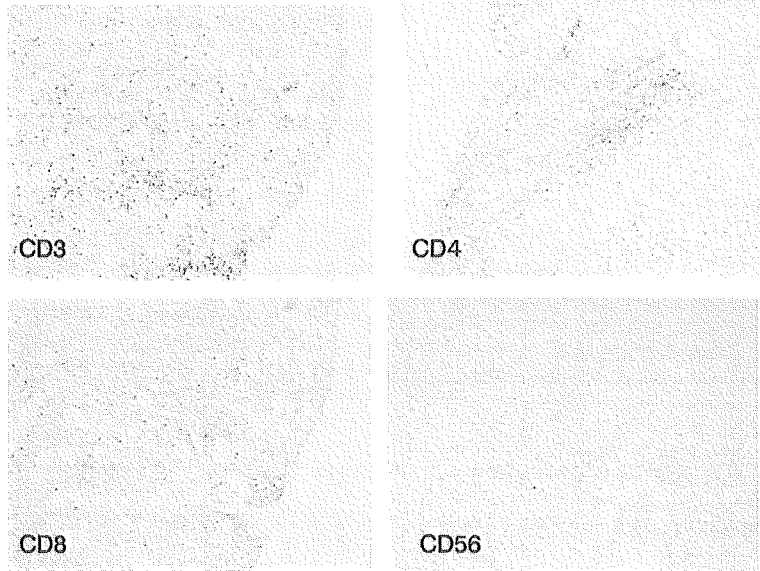
of viral vesicles. Br J Dermatol 153: 981-986, 2005.

2. 学会発表

- 1) 山崎修、松浦浩徳、辻和英、青地聖子、大野貴司、岩月啓氏：ベーチェット病におけるウイルス関連産物に対する宿主免疫応答の解析。ベーチェット病に関する調査研究平成17年度第1回研究班会議（H17.7.22.23 福島）
- 2) 山崎修、森実真、青地聖子、大野貴司、岩月啓氏：ベーチェット病の皮膚粘膜病変部における細胞障害性因子と浸潤細胞について。ベーチェット病に関する調査研究平成17年度第2回研究班会議（H17.12.9-10.福島）
- 3) Yamasaki O, Lin Song-Nan, Yokota K, Oguma K, Iwatsuki K: Immune reactions against oral streptococci and heat shock proteins in Behcet's disease. 14th Japan-Korea Joint Meeting of Dermatology: Symposium Behcet's disease. 2005.11.4-5. in Kumamoto.

H. 知的財産権の出願・登録状況 特記事項なし。

口腔内アフタの浸潤細胞



口腔内アフタの二重染色

