

分担研究報告書

ケモカイン受容体(CXCR3, CCR5)の実験的ぶどう膜炎における役割

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：藤村茂人	東京大学医学部附属病院眼科
蕪城俊克	東京大学医学部附属病院眼科
灰野 誠	東京大学医学部分子予防医学
吉田 淳	帝京大学附属病院眼科
藤野雄次郎	東京厚生年金病院眼科
沼賀二郎	東京都老人医療センター眼科

研究要旨

【目的】 マウス実験的ぶどう膜炎（以下 EAU）における Th1 特異的ケモカインレセプターCXCR3, CCR5 の果たす機能を明らかにする。【方法】 ヒト IRBP アミノ酸残基 1 から 20 位より合成されたペプチド(hIRBP-p)200 μ g を正常 C57BL/6 マウス (WT)、および CXCR3 ノックアウトマウス(CXCR3KO)、および CXCR3 と CCR5 のダブルノックアウトマウス (DKO) に免疫した。免疫後 22 日目における EAU の重症度を臨床的、病理組織学的に検討した。さらに頸部リンパ節と脾臓よりリンパ球を採取し、ペプチドに対する反応性も比較、検討した。【結果】 EAU スコアは検眼鏡的にも組織病理学的にも WT に比して CXCR3KO マウスで有意に高度、WT に比して DKO マウスで有意に高度であった ($p<0.01$)。【結論】 ケモカインによる CXCR3 や CCR5 を介した Th1 細胞へのシグナルが阻害されることにより、何らかの過剰な代償機転がはたらき、かえって疾患を悪化させる可能性が考えられた。

A. 目的

マウスの実験的自己免疫性ぶどう膜炎 (EAU) に関する実験報告として、EAU 発症ピーク直前に、活性化 Th1 細胞が末梢血中に増加していたという報告や¹⁾、主に Th1 細胞が細胞接着因子によってマウスの眼組織内へ浸潤していたとする報告²⁾があり、また、EAU の眼内で Th1 遊走性ケモカインが上昇していたという報告もされている³⁾。即ち、EAU の発症において、Th1 細胞とその遊走に関わるケ

モカインは重要な役割を担っていると考えられている。そして、Th1 細胞には、ケモカイン受容体 CXCR3 や CCR5 が選択的に発現することが知られている。

今回我々は、マウスを使った EAU における CXCR3 や CCR5 の役割を明らかにすることを目的に、CXCR3 ノックアウトマウス (CXCR3KO)やCXCR3 と CCR5 のダブルノックアウトマウス(DKO)を使った実験を行った。なお、DKO を使った実験は、まだ何度か繰り返

す必要があり、不完全なデータしかないため、途中経過のみ示すに留める。

B. 方法

対象は C57BL6 マウス、8 週齢、雌。wild type(WT)と CXCR3KO。免疫は、ヒト IRBP peptide を結核菌毒素を添加した完全アジュバントと混合し、1 匹あたり peptide を 200 μ g、頸部皮下に免疫した。同時に、百日咳菌懸濁液（和光純薬）0.1ml を腹腔内投与した。免疫した日を day0 とし、day22 に眼底検査を施行し、炎症の度合いを評価した。更に sacrifice し、病理組織検査用に眼球を摘出し、リンパ球増殖試験とリンパ球サイトカイン産生試験のために、頸部リンパ節と脾臓を摘出した。なお、これとは別の時期に、DKO マウスに対しても、同数の WT マウスと同時に同様の免疫を行った。これについては、頸部リンパ節と脾臓は摘出せず、これらのリンパ球を使った実験は行われていない。

検査的などどう膜炎評価のために、Thrauらの論文⁴⁾にある clinical score を用いた。この詳細については、表 1 に示す。

病理組織学的などどう膜炎評価についても、Thrauらの論文⁴⁾にある histopathological score を採用した。この詳細については、表 2 に示す。

次に、WT、CXCR3KO の頸部リンパ節細胞・脾細胞を用い、リンパ球増殖試験をおこなった。免疫後 22 日目の WT、CXCR3KO を 5 匹ずつ sacrifice し、頸部リンパ節と脾臓を摘出。リンパ球を回収し、1 well あたり 5×10^5 個ずつ、丸底 96 穴培養プレート(IWAKI)に散布した。それぞれに対し、IRBP-peptide を加えない well、IRBP-peptide が 30 μ g/ml の濃度で添加された well、100 μ g/ml の濃度で添加された well を作り、72 時間培養した。その後 3 H-Thymidine を

加えて 18 時間後にリンパ球に取り込まれた 3 H を測定した。

また、同時に同じ培養リンパ球を使って、リンパ球のサイトカイン産生を調べた。72 時間培養するところまではリンパ球増殖試験と同様で、その後培養液を回収し、培養液中のサイトカイン濃度を ELISA で測定した。測定したサイトカインは IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ であり、測定には Biosource 社の ELISA kit を使用した。

C. 結果

WT マウスと CXCR3KO の clinical score の経過を図 1 に示す。CXCR3KO は 8 日目から、WT マウスは 12 日目頃から発症し始め、CXCR3KO は WT より強い炎症となり、徐々に差が広がってくる様子が認められた。

免疫後 22 日目における clinical score を WT と CXCR3KO で比較した(図 2)。WT の clinical score は平均 0.88 ± 1.33 であったのに対し、CXCR3KO では平均 2.19 ± 1.55 であり、CXCR3KO で有意に高い結果であった($p < 0.01$, Mann-Whitney's U-test)。

次に 22 日目の摘出眼球より、histopathological score を比較した(図 3)。WT の histopathological score は平均 0.79 ± 1.10 であったのに対し、CXCR3KO では平均 2.00 ± 1.52 であり、これも CXCR3KO で有意に高い結果であった($p < 0.01$, Mann-Whitney's U-test)。

リンパ球増殖試験の結果を図 4 に示す。脾臓では、CXCR3KO で WT より増殖傾向が強い傾向が認められた。一方、頸部リンパ節では、WT と CXCR3KO の間に有意差を認めなかった。

脾細胞、頸部リンパ節細胞のサイトカイン産生の結果を図 5 に示す。Th2 細胞が主に産生するとされている IL-4, IL-10 は、脾細胞と頸部リンパ節細胞いずれにおいても、WT と

CXCR3KO の間に有意差を認めなかった。一方、Th2 系寄りのサイトカインであると同時に、炎症急性期に顆粒球系を活性化することで知られる IL-6 は、脾細胞において CXCR3KO で産生が高い傾向が見られた。pro-inflammatory サイトカインである TNF- α は、有意差を認めなかった。また、Th1 系サイトカインである IFN- γ もほぼ有意差を認めなかった。

次に、WT と DKO を用いた実験結果を示す。

免疫後 22 日目における clinical score を WT と DKO で比較した (図 6)。WT では平均 0.63 ± 1.22 であったのに対し、DKO では 2.33 ± 1.79 と有意に高い結果であった ($p < 0.01$, Mann-Whitney's U-test)。

次いで、histopathological score も比較した (図 7)。WT では平均 0.88 ± 1.23 であったのに対し、DKO では 2.65 ± 1.80 と有意に高い結果であった ($p < 0.05$, Mann-Whitney's U-test)。

CXCR3KO や、DKO で炎症が高度になっている原因を調べる目的で、histopathological score が 3 または 4 の組織標本のみを、これまでの実験の中から抽出し、組織浸潤白血球数を、リンパ球と顆粒球に分けて数えた (図 8)。その結果、DKO の浸潤顆粒球が、WT に比較して多いことが判明した ($p < 0.05$, Student t-test)。

以上の結果のまとめを図 9 に示す。

D. 考察

これまで示したように、CXCR3KO や DKO で炎症がより高度となったわけであるが、この現象の理由を明確に説明できる実験結果は得られていない。ただし、脾臓におけるリンパ球増殖試験において、CXCR3KO マウスで WT より有意に高い増殖を示したことから、CXCR3KO で脾臓における IRBP 特異的リンパ球が炎症局所やその付属リンパ節へ遊走でき

ないために脾臓に滞留してしまう可能性が考えられた。また、脾細胞の IL-6 産生が、CXCR3KO で WT より高い傾向がみられたことについては、Takeuchi らの、CCR5KO マウスの実験報告⁵⁾でも、同様の傾向が報告されている。このサイトカインが何らかの形で眼内への顆粒球浸潤に関連し、Th1 リンパ球の機能障害を代償している可能性が考えられた。

一方、in vivo において、CXCR3 の阻害や CXCR3 と CCR5 両者の阻害では Th1 細胞の遊走がそもそも抑制できないという可能性も考えられる。それらのケモカインレセプター阻害によって、かえって顆粒球の浸潤が増強し、結果的に EAU が高度となる可能性が考えられた。

E. 結論

当初、CXCR3KO や DKO で炎症が軽症化することを期待して実験を開始したが、実際は WT に比して双方ともに重症化が認められた。脾細胞のリンパ球増殖試験では、CXCR3KO マウスで有意に増殖が強い結果であった。サイトカイン産生試験では、脾細胞の IL-6 が、CXCR3KO マウスでより高値の傾向にあった。また、DKO の眼内浸潤顆粒球数が WT より有意に増加していた。

なお、DKO に関する実験はまだ不完全なため、今後、DKO におけるリンパ節・脾臓リンパ球の培養・サイトカイン産生実験等、さらなる実験が必要と考えられる。また、CXCR3KO、DKO における EAU 増悪のメカニズムについて、さらなる解明を行っていくことが今後の課題である。

参考文献

- 1) Wu Y, Lin G, et al. IRBP-specific Th1 cells from peripheral blood were predominant in the experimental autoimmune uveitis.

Biochemical and biophysical research communications 2003; 302(1):150-5.

- 2) Xu H, Manivannan A, et al. Recruitment of IFN-gamma-producing (Th1-like) cells into the inflamed retina in vivo is preferentially regulated by P-selectin glycoprotein ligand 1:P/E-selectin interactions. *Journal of immunology* 2004; 172(5):3215-24.
- 3) Ohta K, Yamagami S, et al. Chemokine gene expression in iris-ciliary body during experimental autoimmune uveoretinitis. *Current Eye Research* 2002; 24(6):451-7.
- 4) Thrau S R, Chan C C, et al. Oral tolerance in a murine model of relapsing experimental autoimmune uveoretinitis (EAU): induction of protective tolerance in primed animals. *Clinical and Experimental Immunology* 1997; 109:370-376.
- 5) Takeuchi A, Usui Y, et al. CCR5-deficient mice develop experimental autoimmune uveoretinitis in the context of a deviant effector response. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2005; 46:3753-60.

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. Mingcong Wang, Atsushi Yoshida, Hidetoshi Kawashima, Hiroshi Takahashi, and Junko Hori : Allogeneic amniotic epithelium displays partial immunogenicity and antigenicity in the eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2006. (in print)
2. Kaburaki T, Sato S, Kawashima H, Sakurai S, Numaga J, Fujino Y, and Araie M. : A

hypopyon is a sign of post-trabeculectomy endophthalmitis or not? *Eye*. 19:692-3.2005.

3. Jiro Numaga, Nobuyuki Koseki, Toshikatsu Kaburaki, Hidetoshi Kawashima, Goji Tomita, Makoto Araie. : Intraocular Metabolites of Isopropyl Unoprostone. *Curr Eye Res.* 30:909-13.2005.
4. 蕪城俊克、川島秀俊、吉田 淳、越野 崇、藤村 茂人、藤野 雄次郎、秋山 和英、沼賀 二郎: ぶどう膜炎患者の血清中 soluble CD44 濃度. 平成 16 年度厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班. 平成 16 年度研究業績. pp45-50. 2005.
5. 吉田淳、川島秀俊、沼賀二郎、蕪城俊克、藤野雄次: ベーチェット病に対するステロイド内服症例の検討. 平成 16 年度厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班. 平成 16 年度研究業績. pp65-69. 2005.
6. 高本光子、川島秀俊、蕪城俊克、吉田 淳、沼賀二郎、藤野雄次郎: ベーチェット病に対する第一選択薬コルヒチン使用中に CK 値の上昇を認めた 5 例. 平成 16 年度厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班. 平成 16 年度研究業績. pp75-78. 2005.
7. 本山祐大、蕪城俊克、平岡美依奈、沼賀二郎、藤野雄次郎、川島秀俊: ベーチェット病併発白内障手術成績. *臨床眼科*. 59:1411-1415. 2005.
8. 中村聡、堀貞夫、島川真知子、望月学、杉田直、川島秀俊、上野聡樹、大野重昭: ベーチェット病患者を体操とした抗TNF- α 抗体前期第二相臨床試験成績. *臨床眼科*. 59:1685-1689. 2005.
9. 高本光子、川島秀俊、蕪城俊克、吉田 淳、沼賀二郎、藤野雄次郎: ベーチェット

病に対する第一選択薬コルヒチン使用中にCK値の上昇を認めた5例。臨床眼科. 59:1961-1964. 2005.

10. 藤村茂人、蕪城俊克、秋山和英、吉田淳、沼賀二郎、藤野雄次郎、川島秀俊、：東京大学病院眼科における内眼炎患者の統計的観察。臨床眼科. 59:1521-1525. 2005.
11. 川島秀俊:前房・虹彩所見の記載法、半定量的分類。眼科プラクティス. 田野保雄(編). 分光堂. pp270-275. 2005.
12. 蕪城俊克、川島秀俊:サルコイドーシス～炎症性網脈絡膜疾患をめぐる最近の話題。Ophthalmic Foresight. 10:2-3 2005.
13. 川島秀俊:ベーチェット病の眼病変(病態・診断・治療)。ベーチェット病～病因の解明と難治性病態の克服に向けて。医学のあゆみ 医歯薬出版(株). 東京. 1: 55-59. 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

Grade	Criteria
0	No change
0.5(trace)	1 to 2 very small, peripheral focal lesions; minimal vasculitis/vitritis
1	Mild vasculitis; <5 focal lesion; ≤1 linear lesion
2	Multiple (>5) chorioretinal lesions and/or infiltrations; severe vasculitis (large size, thick wall, infiltrations); <5 linear lesions
3	Pattern of linear lesions; large confluent lesions; subretinal neovascularization; retinal hemorrhages; papilledema
4	Large retinal detachment; retinal atrophy

Grade	Criteria
0	No change
0.5(trace)	Mild inflammatory cell infiltration; no damage
1	Infiltration; retinal folds and focal retinal detachments; few small granulomas in choroid and retina; perivasculitis
2	Moderate infiltration; retinal folds and detachments; focal photoreceptor cell damage; small- to medium-sized granulomas; perivasculitis and vasculitis
3	Medium to heavy infiltration; extensive retinal folding with detachments; moderate photoreceptor cell damage; medium-sized granulomatous lesions; subretinal neovascularization
4	Heavy infiltration; diffuse retinal detachment with serous exudate and subretinal bleeding; extensive photoreceptor cell damage; large granulomatous lesions; subretinal neovascularization

図1: EAU Clinical course

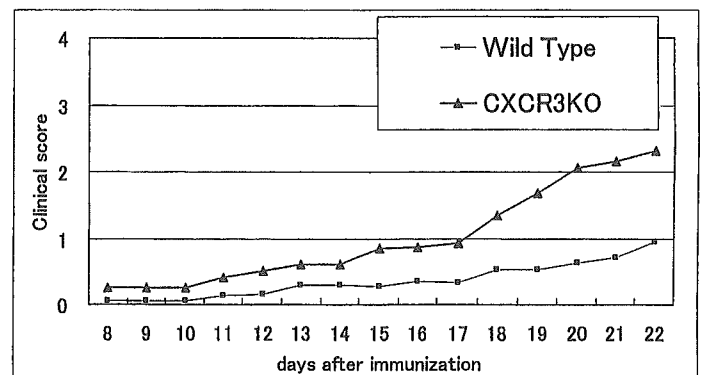
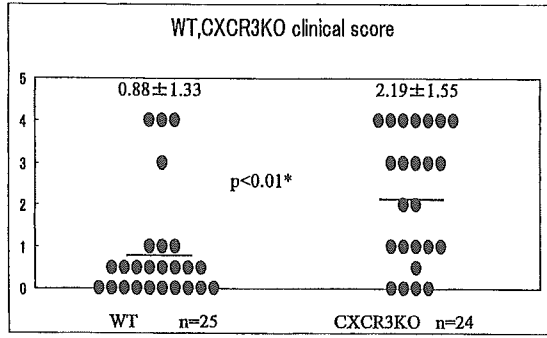
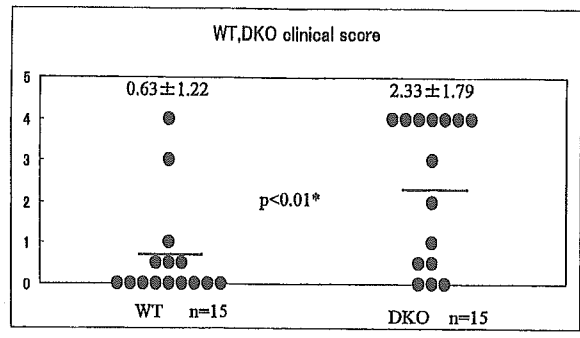


図2: WTとCXCR3KO; Clinical scoreの比較



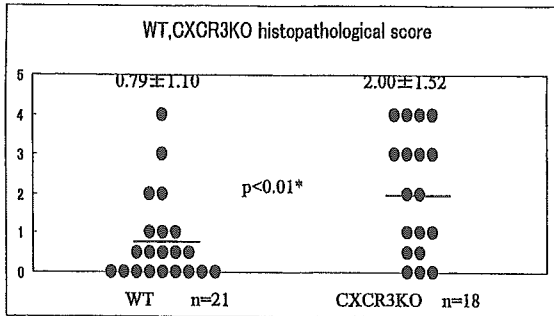
* Mann-Whitney's U-test

図6: WTとDKO; Clinical scoreの比較



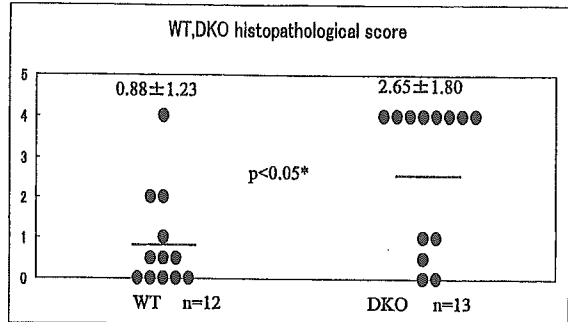
* Mann-Whitney's U-test

図3: WTとCXCR3KO; Histopathological scoreの比較



* Mann-Whitney's U-test

図7: WTとDKO; Histopathological scoreの比較



* Mann-Whitney's U-test

図4: WT(n=5)とCXCR3KO(n=5); リンパ球増殖試験

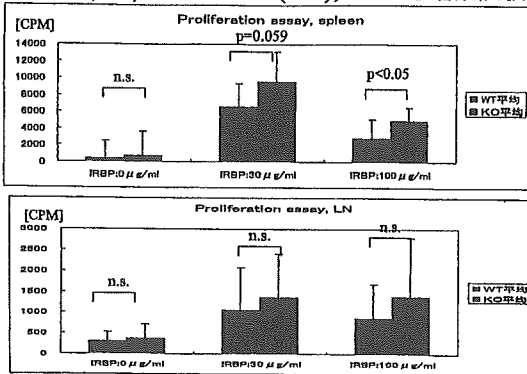
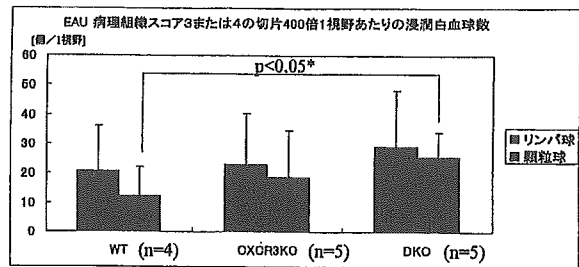


図8: 組織浸潤細胞数



*: Student t-test; WTとDKOの浸潤顆粒球数のみ有意差あり。他は有意差なし。

図5: サイトカイン産生試験; WTとCXCR3KO

Cytokine	IL-4			IL-6			IL-10		
	0	30	100	0	30	100	0	30	100
IRBP: peptide (μg/ml)									
Spleen cells									
WT average	14.03	89.29	24.53	0.00	35.40	11.23	0.00	0.00	7.88
CXCR3(-/-) average	85.80	43.55	40.58	0.00	205.81	98.43	0.00	8.31	0.00
significance	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p=0.047	p=0.058	n.s.	n.s.	n.s.
Lymph node cells									
WT average	34.71	47.55	21.58	0.00	4.98	0.00	0.00	8.17	0.00
CXCR3(-/-) average	28.47	30.47	63.80	20.08	16.87	16.27	13.19	10.78	21.24
significance	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Cytokine	TNF-α			IFN-γ		
	0	30	100	0	30	100
IRBP: peptide (μg/ml)						
Spleen cells						
WT average	0.00	0.00	0.00	34.80	39.40	38.21
CXCR3(-/-) average	0.00	0.00	0.00	0.00	68.38	23.03
significance	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Lymph node cells						
WT average	0.00	0.00	0.00	0.81	0.00	0.00
CXCR3(-/-) average	0.00	0.00	0.00	18.87	8.38	38.12
significance	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p=0.018

WT(n=5)
CXCR3KO(n=5)

図9: 結果のまとめ

実験項目	結果
clinical score	WTに対しCXCR3KO, DKOで有意に重症化
histopathological score	WTに対しCXCR3KO, DKOで有意に重症化
リンパ球増殖試験、脾臓	WTに対しCXCR3KOで有意に上昇
リンパ球増殖試験、リンパ節	WTとCXCR3KOの有意差無し
サイトカイン産生、脾臓	WTに対しCXCR3KOのIL-6が上昇
サイトカイン産生、リンパ節	WTとCXCR3KOの有意差無し
組織浸潤細胞	DKOの眼内浸潤顆粒球数がWTより有意に増加

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

ベーチェット病における白血球の異常に関する研究

分担研究者 中村晃一郎、陳喜雪、尾山徳孝、金子史男¹⁾、藤田禎三²⁾、
西田朋美、水木信久³⁾
1) 福島県立医科大学皮膚科 2) 福島県立医科大学免疫学
3) 横浜市立大学眼科学

研究要旨

ベーチェット病（BD）は口腔内潰瘍、陰部潰瘍、眼症状、結節性紅斑を主症状とし血管病変を生じる慢性の難治性疾患である。これまで BD 患者の皮膚病変に、口腔内レンサ球菌 *Streptococcus(S.) sanguinis* の DNA 成分が認められ、BD の病態に関与することが明らかとなっている。今回、グラム陽性菌と結合するフィコリンの BD における機能を明らかにするため、BD の FCN 遺伝子多型の存在について検討した。BD 患者、健常人において Ficolin-2 promoter、exon8 SNP 解析を施行した。その結果、BD 患者群の HLA-B51 陽性群、陰性群での FCN2 の SNP 解析 (promoter、exon8 領域) で、FCN 遺伝子多型の allele 頻度で、-557、-64 領域に両群間に統計的な有意差を認めた ($p < 0.003$ 、 $p < 0.002$)。以上より自然免疫である ficolin の経路に BD が関与しており、HLA-B51 と関与している可能性が示唆された。

A.研究目的

ベーチェット病（BD）は口腔内潰瘍、陰部潰瘍、眼症状、結節性紅斑を主症状とし血管病変を生じる慢性の難治性疾患である。これまで BD 患者の皮膚病変に、口腔内レンサ球菌 *S. sanguinis* の DNA 成分が認められ、BD の病態に関与することが明らかとなっている。

Ficolin は生体防御レクチンであり、C3 を介して補体を活性化することによって自然免疫の制御に関与する。Ficolin-1 から Ficolin-3 に分類され、Ficolin 1、2 遺伝子 (FCN1, 2 遺伝子) は第 9 染色体上に、また FCN 3 遺伝子は第 1 染色体上に存在する。Ficolin 2、3 蛋白は血清中に検出され、Ficolin 1 は単核球の表面に存在する。Ficolin は細菌の糖鎖 GlcNAC (N acetyl glucosamine) に結合し、C3 などの補体を活性化する。Ficolin 2 はレンサ球菌をはじめとするグラム陽性菌の表面のリポタイコ酸に結合し、補体を活性化し、自然免疫への関与が明らかとなっている。ヒト FCN2 遺伝子多型として、promoter 領域で 5 箇所、exon 領域(exon 3, 6, 8) で 5 箇所の遺伝子多型が報告されている。これらの SNP の存在によって血清フィコリン濃度が変化することが報告され

ている。プロモーター領域では Ficolin 蛋白産生が変化し、血清 Ficolin の濃度の変化が認められる。-907A>G SNPs によって血清 Ficolin 濃度が低下し、-602G>A SNPs では血清 Ficolin が濃度の増加が報告されている。

今回、グラム陽性菌と結合する Ficolin の BD における機能を明らかにするため、BD の FCN 遺伝子多型の存在について検討した。

B.研究方法：Ficolin の BD における機能を明らかにするため、BD の FCN 遺伝子多型について検討した。BD 患者 83 名、健常人 64 名において direct sequence 法にて Ficolin-2 (promoter、exon8) SNP 解析を施行した。

C.研究結果：BD 患者(n=83)、健常人(n=64)における FCN2 promoter、exon8 領域の SNP 解析では、genotype 頻度、allele 頻度において、両群間に統計的な有意差を認めなかった (表 1:BD、健常人における genotype 頻度)。また BD 患者群の中で、臨床別に検索した。完全型 (48 名)、不完全型 (35 名) において、FCN2 遺伝子 (promoter、exon8 領域) の SNP では、genotype 頻度、allele 頻度において両者間に

統計的な有意な差を認めなかった(表2:完全型、不完全型における allele 頻度)。BD 患者群の HLA-B51 陽性群(37 名)、陰性群(46 名)での FCN2 の SNP 解析 (promoter、exon8 領域) を検討した。FCN 遺伝子多型の allele 頻度で、-557、-64 領域に統計的な有意差を認めた(0.003、0.002)。(表3:HLA-B51 陽性群と陰性群における allele 頻度)。

また本邦における FCN2 遺伝子の haplotype については、54%、以下 21.7%、8.3%と認められた(表4)。

今回の検討では、FCN 遺伝子の本邦における多型解析を行い、その頻度を明らかにした。これまでの統計報告では Caucasian 民族の頻度であり、本研究によって本邦における FCN 遺伝子 promoter、exon8 領域の SNPs 頻度が明らかになった。BD における FCN 遺伝子多型解析では、とくに HLA-B51 陽性群と陰性群で、FCN 遺伝子 promoter -557、-64 領域で SNP 頻度発現の有意差を明らかにした。これまで FCN 遺伝子 promoter 領域と血清 Ficolin 濃度の関連では promoter 領域 -987、-64 領域が報告されている。今回明らかになった領域と血清 Ficolin 濃度との関連についてはさらに検討が必要である。BD において HLA-B51 の関連する群で Ficolin 遺伝子の関与する可能性を示している。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Kagami S, Saeki H, Komine M, Kakinuma T, Tsunemi Y, Nakamura K, Sasaki K, Asahina A, Tamaki K. Interleukin-4 and interleukin-13 enhance CCL26 production in a human keratinocyte cell line, HaCaT cells. Clin Exp Immunol. 2005;141(3):459-66.

Sugaya M, Nakamura K, Asahina A, Fujita H, Tada Y, Torii H, Tamaki K. Signaling through CD40 ligand decreases CD80 expression on murine Langerhans cells and enhances IL-12 p40 production. Biochem Biophys Res Commun. 2005;331(4):1045-52.

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

表1. BD(n=83)、健康人(n=64)における FCN2 promoter、exon8領域のSNPのgenotype頻度

SNPs	BD (n=83) Genotype			Healthy Control (n=64) Genotype			P
	G/G	G/A	A/A	G/G	G/A	A/A	
-987	66 (79.5)	17 (20.5)	0 (0.0)	52 (81.3)	11 (17.2)	1 (1.6)	0.53
-602	73 (88.0)	10 (12.0)	0 (0.0)	58 (90.6)	6 (9.4)	0 (0.0)	0.68
-557	A/A	A/G	G/G	A/A	A/G	G/G	
	60 (72.3)	22 (26.5)	1 (1.2)	43 (67.2)	18 (28.1)	3 (4.7)	0.49
-64	A/A	A/C	C/C	A/A	A/C	C/C	
	61 (73.5)	21 (25.3)	1 (1.2)	43 (67.2)	18 (28.1)	3 (4.7)	0.46
-4	A/A	A/G	G/G	A/A	A/G	G/G	
	77 (92.8)	6 (7.2)	0 (0.0)	56 (87.5)	7 (10.9)	1 (1.6)	0.45
+6359	C/C	C/T	T/T	C/C	C/T	T/T	
	78 (94.0)	5 (6.0)	0 (0.0)	58 (90.6)	5 (7.8)	1 (1.6)	0.47
+6424	G/G	G/T	T/T	C/C	C/T	T/T	
	63 (75.9)	20 (24.1)	0 (0.0)	46 (71.9)	16 (25.0)	2 (3.1)	0.26

表2. BD(n=83) 完全型、不完全型でのFCN2のSNP解析 (promoter、exon8領域)(genotype)

SNPs	Complete type BD (n=48) Genotype			Incomplete type BD (n=35) Genotype			P
	G/G	G/A	A/A	G/G	G/A	A/A	
987	40(83.3)	8(6.7)	0(0.0)	26(74.3)	9(25.7)	0(0.0)	0.31
-602	G/G	G/A	A/A	G/G	G/A	A/A	
	45(93.8)	3(6.2)	0(0.0)	28(80.0)	7(20.0)	0(0.0)	0.06
-557	A/A	A/G	G/G	A/A	A/G	G/G	
	36(75.0)	12(25.0)	0(0.0)	24(68.6)	10(28.6)	1(2.8)	0.45
-64	A/A	A/C	C/C	A/A	A/C	C/C	
	37(77.1)	11(22.9)	0(0.0)	24(68.6)	10(28.6)	1(2.8)	0.40
-4	A/A	A/G	G/G	A/A	A/G	G/G	
	44(91.7)	4(8.3)	0(0.0)	33(94.3)	2(5.7)	0(0.0)	0.65
+6359	C/C	C/T	T/T	C/C	C/T	T/T	
	45(93.8)	3(6.2)	0(0.0)	33(94.3)	2(5.7)	0(0.0)	0.92
+6424	G/G	G/T	T/T	G/G	G/T	T/T	
	36(75.0)	12(25.0)	0(0.0)	27(77.1)	8(22.9)	0(0.0)	0.82

表3. BD(n=83) HLA-B51陽性、陰性群でのFCN2のSNP解析 (promoter, exon8領域)(allele)

type SNPs	BD (n=83) allele				p
	HLA-B51(-) N=37		HLA-B51(+) N=46		
-987	G	A	G	A	0.83
	66(89.2)	8(10.8)	83(90.2)	9(9.8)	
-602	G	A	G	A	0.10
	67(90.5)	7(9.5)	89(96.7)	3(3.3)	
-557	A	G	A	G	0.02
	58(78.4)	16(21.6)	84(91.3)	8(8.7)	
-64	A	C	A	C	0.03
	59(79.7)	15(20.3)	84(91.3)	8(8.7)	
-4	A	G	A	G	0.16
	73(98.6)	1(1.4)	87(94.6)	5(5.4)	
+6359	C	T	C	T	0.26
	73(98.6)	1(1.4)	88(95.7)	4(4.3)	
+6424	G	T	G	T	0.32
	63(85.1)	11(14.9)	83(90.2)	9(9.8)	

表4. BD、健常人でのFCN2 promoter, exon8領域におけるhaplotype頻度

Haplotype -987 -602 -557 -64 -4 +6259 +6424	BD (n=83)	Control (n=64)	χ^2 検定 6.37 P=0.606
gg gg aa aa aa cc gg	45 (54.3%)	34 (53.1%)	
gg gg ga ac aa cc gt	19 (22.9)	13 (20.3)	
ga ga aa aa aa cc gg	8 (9.6)	5 (7.8)	
ga gg aa aa ag ct gg	5 (6.0)	3 (4.7)	
ga ga ga ac aa cc gt	2 (2.4)	3 (4.7)	
ga gg aa aa ag cc gg	2 (2.4)	1 (1.6)	
gg gg ga ac aa cc gg	2 (2.4)	1 (1.6)	
ga gg ga ac ag ct gt	0 (0)	2 (3.1)	
ga gg ga ac ag ct gt	0 (0)	2 (3.1)	

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

TNF- α によるHO-1発現調節
— 抗TNF抗体治療効果発現におけるHO-1の関与 —

分担研究者	石ヶ坪良明（横浜市立大学大学院医学研究科 病態免疫制御内科学）
研究協力者	桐野洋平（横浜市立大学大学院医学研究科 病態免疫制御内科学）
	岳野光洋（横浜市立大学大学院医学研究科 病態免疫制御内科学）

Heme oxygenase (HO)-1は抗炎症作用をもつストレス誘導性の蛋白であり、炎症性疾患への臨床応用が期待されている。本研究では、ベーチェット病を対象として現在治験中である抗TNF α 療法の作用メカニズムを解析する目的で、単球分画を用いてTNF α をはじめとした炎症性サイトカインとHO-1発現との関連性を解析した。健常者の末梢血単核細胞（PBMC）では、主としてCD14陽性細胞にmRNAおよび蛋白レベルでHO-1の発現が確認された。この発現は*in vitro*でIL-4/IL-10添加により増強し、TNF- α 添加により低下した。一方、TNF- α の産生はHO-1強制発現により低下し、HO-1 siRNA導入により増加した。

これらの結果は、ベーチェット病の病態に重要な役割を担うTNF- α とHO-1の発現は相互に逆相関の関係にあり、TNF α 産生を抑制し抗炎症性作用を持つHO-1がベーチェット病の治療標的となる可能性を示唆している。

A. 研究目的

Heme Oxygenase (HO)-1は、酸化ストレス、サイトカインなど多様な刺激によって誘導されるストレス蛋白で、ヘムをCO、ビリベルジン、2価鉄に分解する。COにはMAPKのリン酸化を介して炎症制御、血管拡張作用、抗アポトーシス作用が認められ、ビリベルジンはビリルビンに代謝され抗酸化作用を発揮する。2価鉄は抗酸化作用を有するフェリチンを誘導する。HO-1はこれらの代謝産物による"cytoprotection"と総称される機能を有しており、炎症性疾患への治療応用も期待されている。当教室でも肺の炎症性疾患モデルマウスに対するHO-1遺伝子治療、SLEモデルマウスにおけるHO-1誘導療法の有効性を報告してきた。

炎症性疾患の病態におけるHO-1の役割についての報告も見られるようになり、私どもも高フェリチン血症を呈する血球貪食症候群や成人スティル病で血清HO-1が高値

であること、関節リウマチ（RA）では血清での異常は見られないものの、滑膜組織にHO-1が発現し、炎症制御に重要な役割を担っていることなどを報告している。

ベーチェット病ではTNF- α を中心とした炎症性サイトカインの病態への関与が指摘されており、近年、抗TNF- α 抗体治療の有効性も報告され、追試の治験も進行中である。そこで、本研究ではベーチェット病におけるHO-1の役割を検討する目的でヒト末梢血単核細胞（PBMC）および単球を用いてHO-1の発現とTNF- α をはじめとする炎症性サイトカインの関連性について検討した。

B. 研究方法

① 対象：健康成人、ベーチェット病患者。
（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フイコール比重遠心法により PBMC を分離し、MACS 法にて CD14 +/- 細胞に分離した。
- ③ 細胞培養：PBMC を各種サイトカイン、キメラ型抗 TNF- α 抗体 (infliximab)、HO-1 誘導剤である auranofin 存在下で培養した。
- ④ RT-PCR 法：Trizol を用いて細胞から RNA を抽出し、cDNA を合成し、HO-1、 β -actin、CD14 の mRNA 特異的 primer を用いて thermal cycler にて増幅した。
- ⑤ Western blotting 法：細胞抽出蛋白を SDS 添加後 95°C 2 分加熱し、4-20% ポリアクリルアミドゲルで展開後、PVDF 膜に転写し、抗ヒト HO-1 モノクローナル抗体を用いて HO-1 蛋白を検出し、densitometry を用いて半定量的に解析した。
- ⑥ ELISA 法：細胞培養 24 時間後に培養上清を回収し、TNF- α を測定した。

C. 研究結果

- ① 健常者の PBMC は少量ながらも HO-1 蛋白を発現しており、その主体は CD14 陽性細胞であった。mRNA 発現も同様の結果であった (図 1)。
- ② PBMC を IL-4、IL-10、TNF- α 、IFN- γ 、IL-12 で刺激、24 時間後の HO-1 発現を Western blotting 法により検討した結果、IL-4 および IL-10 添加で HO-1 が高度に誘導されたが TNF- α 添加では抑制された (図 2)。
- ③ TNF- α による HO-1 の発現抑制効果は infliximab 前処理により解除された (図 3 上)。Auranofin に誘導される HO-1 の発現も TNF- α 添加により抑制されるが、infliximab 前処置により解除された (図 3 下)。
- ④ CD14 陽性細胞に HO-1 発現プラスミドを導入すると、有意な HO-1 の発現誘導とともに、自発的な TNF- α の産生低下が認められ (図 4)、HO-1 siRNA 導入によりその産生増加が認められた。

D. 考察

HO-1 は健常人末梢血単核細胞の単球に高度に発現し、非炎症状態でも生体にとって重

要な役割をはたしていると考えられる。これは HO-1 欠損患者が全身性の炎症にて天逝した報告からも伺える。IL-10 は HO-1 を介して抗炎症作用を発揮することが報告されているが、私どもの結果でも同様に抗炎症性サイトカインである IL-4 あるいは IL-10 により HO-1 の発現は増加した。一方で TNF- α は HO-1 の発現を抑制し、IL-4、auranofin などによる HO-1 誘導効果をも減弱させた。さらに、単球における HO-1 発現と炎症性サイトカイン産生は逆相関の関係にあり、HO-1 の抗炎症作用機構の一部に炎症性サイトカイン産生制御の関与が推測される。これらの結果から、TNF- α は単球の HO-1 発現の抑制を介して、多様な炎症性サイトカイン産生を増強させ、炎症をさらに増悪させる悪循環を形成していることが考えられる (図 5)。

炎症性サイトカインを標的として登場した infliximab の関節リウマチに対する有効性はすでに確立しているが、ベーチェット病治療にも有望とされている。私どもは以前ベーチェット病患者に対する infliximab 治験中に末梢血単核球を用いてサイトカイン産生細胞を解析した。その結果、infliximab は単に血中の TNF- α を中和するのみならず、TNF- α 産生細胞も減少させることにより、抗炎症作用を持続的に発揮していることを明らかにした。今回の解析結果から、infliximab の抗炎症作用のメカニズムの一つとして、ベーチェット病で認められる TNF- α 産生の亢進が HO-1 の発現を低下させるという悪循環を infliximab が遮断する可能性も考えられる。すなわち、infliximab は可溶性 TNF- α を中和すると同時に、TNF- α による HO-1 発現抑制を解除させることにより、相対的に HO-1 発現を増強し、その結果 TNF- α の産生そのものが抑制されることが infliximab の抗炎症効果発現メカニズムの一つである可能性がある (図 5)。

現時点ではベーチェット病患者からの血清、末梢血単核細胞、好中球を対象とした検討では血清 HO-1 蛋白、単球 mRNA レベルの異常は明らかでないが、TNF- α がベーチェット病の病態に重要な役割を担うことから、HO-1 を標的分子とした抗炎症療法は難病とされるベーチェット病の有望な治療法となる可能性がある。

E. 結論

TNF- α はHO-1発現を抑制することで、炎症増悪の悪循環を形成しており、TNF阻害薬はこの悪循環を遮断することで持続的な薬理効果を発揮している可能性が示唆された。サイトカインとHO-1発現の関連を検討することで、ベーチェット病をはじめとした炎症性疾患の病態解明が期待されるとともに、HO-1が治療標的として有望であることが改めて確認された。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kirino Y, Ishigatsubo Y et al. Increased serum HO-1 in hemophagocytic syndrome and adult-onset Still's disease: use in the differential diagnosis of hyperferritinemia. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(3):616-24, 2005
- 2) Kobayashi H, Ishigatsubo, Y et al. Heme oxygenase-1 plays a regulatory role in inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* (in press)
- 3) 桐野洋平、岳野光洋、小林秀郎、石ヶ坪良明：炎症性疾患におけるHeme oxygenase-1 (HO-1)の発現. *炎症・再生* 25: 431-435, 2005
- 4) 岳野光洋、石ヶ坪良明：Behcet病におけるヘムオキシゲナーゼ1の役割. *医学のあゆみ* 215: 33-37, 2005
- 5) 石ヶ坪良明、岳野光洋：膠原病と血栓、ベーチェット病 13:49-53, 2005
- 6) 石ヶ坪良明：Heme oxygenase-1 (HO-1)と炎症性疾患. *リウマチ科* 36:2006 (in press)

H. 知的所得権の取得状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

図1

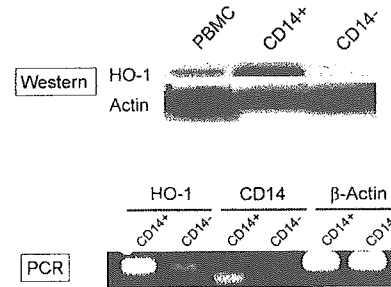


図2

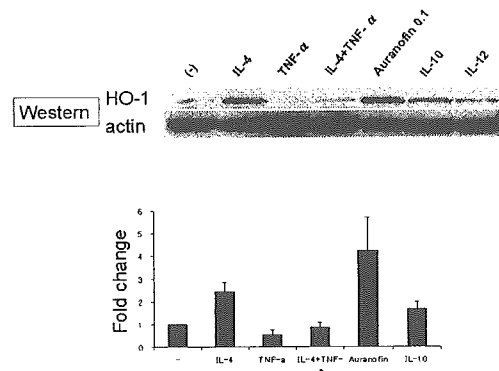


図3

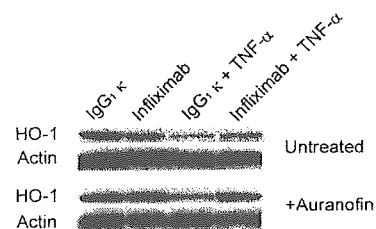


图4

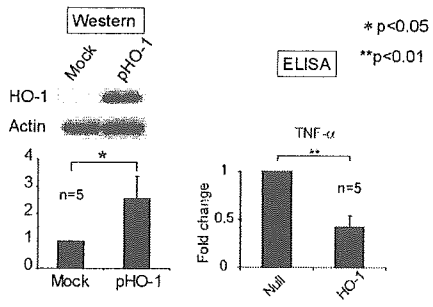
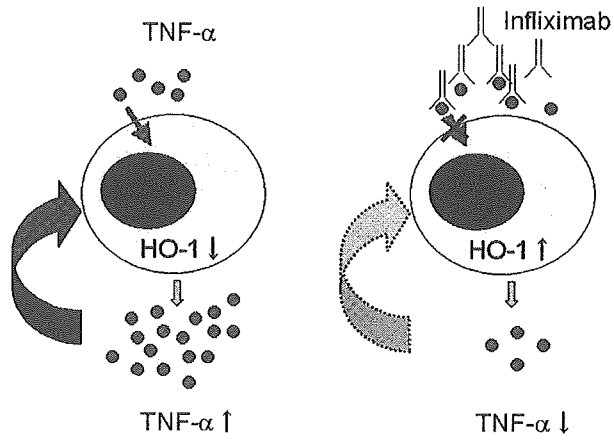


图5



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

口腔フローラのメタゲノム解析とバイオマーカーによる炎症評価に関する研究

分担研究者	磯貝恵美子	北海道医療大学歯学部口腔衛生学教室
研究協力者	磯貝 浩	札幌医科大学医学部実験動物施設
	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
	小熊恵二	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

口腔内には多種多様の細菌が存在し、フローラを形成している。メタゲノム解析は培養を行うことなく、フローラ解析を行うことができる。フローラ中の病原細菌が優勢になれば、口腔内に炎症が起きる。そこで、口腔に炎症を有するモデル動物のメタゲノム解析を行うとともに酸化ストレスマーカーをはじめとする評価方法について検討した。

PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis: 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動) では試料中の構成細菌を反映すると考えられる 16SrDNA の泳動像を得た。健康な歯肉の犬では泳動像はほぼ同じであった。一方、口腔内に炎症をもつ犬では泳動像は多様化し、特有のバンドが観察できた。T-RFLP(Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism)プロファイルの OTU 値を元にデータベースによって検索を行い、菌種の推定と OTU 面積比の算出から優占種を推定した。口腔内が健全な時は比較的安定したフローラを構成するが、炎症時のパターンは複雑化した。口腔内に炎症があれば酸化ストレスマーカーの唾液中の濃度は有意に高かった。パーチェット病においては、血清中のヘキサノイルリジン (HEL) が有意に高い値を示しており、酸化ストレスは全身へも波及していることが示唆された。

A. 研究目的

パーチェット病の発症には、内因としての疾患感受性遺伝子と特殊な口腔内レンサ球菌に対する免疫反応が関与すると考えられている。本研究ではこの発症に寄与する外因との関連を細菌感染-炎症のモデルから明らかにしたいと考えた。人への応用を行う前にはモデル系での評価方法の確立が必要である。口腔内には多種多様の細菌が存在している。それらは必ずしも培養できるとはかぎらない。近年、ヒトの糞便や歯周病菌垢について、メタゲノム解析が行われている。このような培養を行わない方法は野生動物の糞便解析に有用であることをすでに報告した。ここでは、口腔内に炎症を有するイヌの口腔フローラ解析への応用について検討した。さらに、炎症評価方法として酸化ストレスの定量を試みた。活性酸素種による脂質の過酸化は、生体機能の障害や疾病に深く関わっている。脂質の過酸化反応において、初期段階では脂質ペルオキシド、後期段階ではア

ルデヒドが生成される。これらの脂質過酸化物は反応性が高いために蛋白質・核酸といった生体分子と結合して、比較的安定な生成物を形成する。「ヘキサノイルリジン」(Nε-(Hexanoyl) Lysine: HEL) は1999年にその存在が報告された物質であり、リノール酸ヒドロペルオキシドとリジン残基との反応によって生じる新規な脂質-リジン付加体である。本研究では生体中の脂質系酸化ストレスの評価をヘキサノイルリジンのELISAによって行い、従来の8-ヒドロキシ-デオキシグアノシン(8-OHd、水溶性)と組み合わせることにより、生体内の酸化ストレスをよりの確に多面的に捉えることを目的とした。

B. 研究方法

実験動物としてはビーグル犬を用いた。唾液あるいは菌垢の口腔細菌由来 DNA は 16SrDNA を標的に PCR を行い、PCR-DGGE および T-RFLP で解析を行った。DNA の抽出は

ビーズ法、精製は GFX カラムによった。DNA は PCR 法によって 16S rDNA の約 1000bp を増幅した。得られた PCR 産物を 2 通りの方法で断片化した。すなわち、*Bfal* と *RsaI* による 2 重消化方法と *BsII* を用いた方法である。T-RFLP によるフラグメント解析の結果は OTU (operational taxonomic unit) の値をもとに行った。あらかじめ DGGE から得られた塩基配列によって検索を行い、優占種の推定を行うことを条件とした。

口腔内の病態を知る方法として脂質系酸化ストレスの評価をヘキサノイルリジン (N ϵ -Hexanoyl) Lysine: HEL) の ELISA (日本老化制御研究所、静岡) によって行った。また、8-ヒドロキシ-デオキシグアノシン (8-OHd、水溶性) についても同様に検討した。HEL および 8-OHd はベーチェット病患者血清についても調べた。

C. 研究結果

PCR-DGGE において試料中の構成細菌を反映すると考えられる 16SrDNA の泳動像を得た。すなわち、口腔内が健康な 1 歳齢の犬では泳動像はほぼ同じであった。これらの犬の口腔内から病原細菌である黒色集落形成性 *Porphyromonas* 属 (BPP) は分離できるがその割合は 2% 以下であった。一方、歯周炎の病巣を持つ犬 (4-6 歳) では泳動像は多様化し、特有のバンドが観察できた。シークエンスによって同定したバンドはほとんどが未知のものであり、種レベルの同定には至らなかった。BPP のバンドは歯周炎を呈する犬で認められた。これらの犬の口腔からは高率に BPP が分離され、またフローラ中の BPP 割合も高かった。T-RFLP プロファイルの OTU 値を元にデータベース検索を行い、菌種の推定と OTU 面積比の算出から優占種を推定した。口腔内が健康な時は比較的安定したフローラを構成するが、歯周病発症時には非常に単純なフローラと複雑なフローラの 2 つのパターンが存在していた。

口腔内に炎症を有するビーグル犬では対照に比べて酸化ストレスマーカーである HEL の唾液中の濃度は有意に高かった (図 1)。また、唾液は血清に比べて口腔内の炎症状況をよく反映していると考えられた。8-OHd は唾液および血清ともに炎症を有する犬で有意差はないものの高い値を示した。ベーチェット病においては、血清中の HEL が健康成人に比べて有意

に高い値を示した (図 2)。

D. 考察

健康な口腔状態は安定したフローラを構成するが、病的状態になると特定病原細菌の増加だけでなくフローラそのものが複雑に変化することがわかった。細菌は個別でなく集団で行動する性質を持っている。細菌同士は細菌間情報伝達機構を有し、cross-talk することが知られている。Quorum sensing (定数感知) はそのひとつであり、周囲の細菌密度を感知し、病原因子産生の制御をしている。免疫系細胞がサイトカインによって cross-talk するように細菌-特にフローラ構成細菌間でも同様のことがおこっていることは興味深い。病態の制御は個別の細胞、あるいは特殊な細菌を抑制するというだけでなく、集合体としての細胞や細菌を考えた上での戦略が必要といえよう。

口腔内に炎症を有するビーグル犬では対照 (炎症を有さない) に比べて HEL および 8-OHd の唾液中の濃度は有意に高かった。また、唾液は血清に比べて口腔内の炎症状況をよく反映していると考えられた。ベーチェット病においては、血清中の HEL が有意に高い値を示した。唾液での検討を行えば、より明確な酸化ストレスのマーカーとしての意義を見いだせるかもしれない。

E. 結論

以上の結果から PCR-DGGE および T-RFLP は口腔フローラ解析に有用であることがわかった。口腔内の炎症の酸化ストレスマーカーは客観評価として重要である。ベーチェット病において、血清中の HEL が有意に高い値を示した。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

著書

1. 磯貝恵美子、腎盂腎炎、獣医内科学、文永堂出版 (日本獣医内科学アカデミー編)、P.117-118, 2005

総説

1. 磯貝恵美子、磯貝 浩：レプトスピラ病、からだの科学 242, 61-66, 2005

原著

1. 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 Microbiology* 7(1),79-90, 2005
2. 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-Behçet's disease. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 43(2), 125-131, 2005
 3. Takaya A, Kubota Y, Isogai E, Yamamoto T
Degradation of the HilC and HilD regulator proteins by ATP-dependent Lon protease leads to down-regulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 gene expression. *Molecular Microbiology*, 55(3), 839-852, 2005
 4. 松原光憲、磯貝恵美子、磯貝 浩 大腸菌性心内膜炎のイヌの1例 *J. Vet. Med.*, 58(4), 277-280, 2005
 5. Isogai E, Makungu C, Yabe J, Sinkala P, Nambota A, Isogai H, Fukushi H, Silungwe M, Mubi t a C, Syakalima M, Hang'ombe B M, Kozaki S, Yasuda J
Detection of *Salmonella invA* by isothermal and chimeric primer-initiated amplification of nucleic acids (ICAN) in Zambia *Comp Immunol Microbiol Inf Dis*, 28, 363-370, 2005
 6. Isogai E, Silungwe M, Sinkala P, Chisenga C, Mubita C, Syakalima M, Hang'ombe B M, Makungu C, Yabe J, Simuunza M, Nambota A, Isogai H, Fukushi H, Yasuda J
Rapid detection of *Salmonella* on commercial carcasses by using isothermal and chimeric primer-initiated amplification of nucleic acids (ICAN)-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in Zambia. *J Appl Res*, in press, 2005
 7. Kawahara
Novel genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma centrale* and a novel *Ehrlichia* species in wild deer and ticks on two major islands in Japan. *Int J Syst Evol Micorobiol*, in press, 2005

2. 国際学会発表

1. Isogai H, Isogai E, Nishikawa T.
Application of ICAN Methods for Detection of *invA* Gene from *Salmonella enteritidis* Isolated from Foods in Zambia. 105th General Meeting, American Society for Microbiology, Atlanta, USA, June 5-9, 2005
2. Nishikawa T, Isogai E, Isogai H, Ohba T, Yunoki S, Arashima S, Tanaka K, Adachi K,

Okayasu T. Bactericidal Effects of Human Cationic Antimicrobial Protein 18 (hCAP18) and its Analogues on *Staphylococcus aureus*. 105th General Meeting, American Society for Microbiology, Atlanta, USA, June 5-9, 2005

3. Isogai E, Okumura K, Hirose K, Isogai H, Nishikawa T. Active Domain of CAP18/LL37 Induces Apoptosis of Activated T Cells. 105th General Meeting, American Society for Microbiology, Atlanta, USA, June 5-9, 2005

H. 知的財産権の出願、登録状況
特記事項なし。

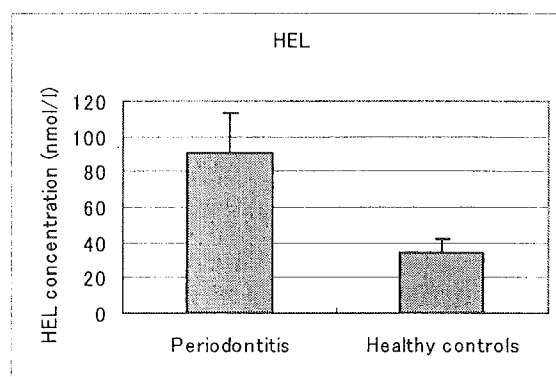


図1. 口腔内に炎症を有するビーグル犬唾液中の酸化ストレスマーカーHELの濃度

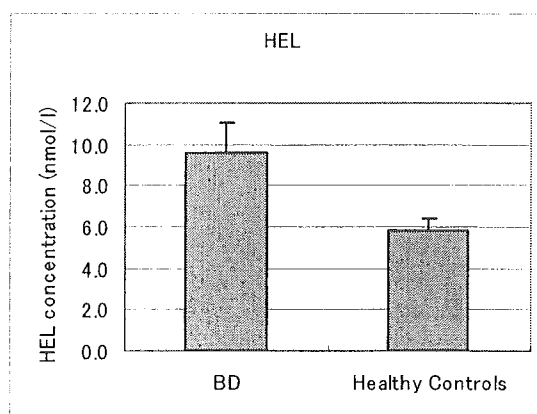


図2. ベーチェット病患者血清中の酸化ストレスマーカーHEL濃度

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

ベーチェット病におけるシクロスポリンの治療効果と遺伝子多型性

太田正穂：信州大学医学部法医学教室
勝山善彦：信州大学付属病院薬剤部
西田朋美、伊藤亜紀子、水木信久：横浜市立大学大学院視覚器病態学
竹本裕子、南場研一、大野重昭：北海道大学医学部視覚器病学

研究要旨

ベーチェット病は再発性口腔内アフタ潰瘍、結節性紅斑などの皮膚症状、ぶどう膜・網膜の炎症と外陰部潰瘍の4つを主症状とする疾患であり、特定の遺伝的背景のもとに何らかの外的環境要因働いて発症する多因子性疾患と考えられている。遺伝因子としてはHLA-B51 遺伝子と強く相関することが知られている。本病はシルクロード周辺のモンゴロイドに多発し、欧米人には稀な疾患であるため、シルクロード周辺に何らかの環境要因が示唆されており、シルクロード病とも言われている。本病の眼発作予防に対し、強力な免疫抑制作用を示すシクロスポリン (CYA) が有効で5mg/kg/日で投与されるが、CYA の効果に個人差があることが報告されている。今回私達は、ベーチェット病患者における CYA の効果と血中濃度との関係を検討するにあたり、CYP3A4, CYP3A5, MDR1, シクロフィリン A の遺伝子多型との相関について調べた。その結果 MDR1 遺伝子のプロモーター領域、エクソン 21 および 26 の SNPs (single nucleotide polymorphisms) が CYA の血中濃度 AUC_{0-4} 値と有意に相関していることが認められた。このことは CYA の吸収に関する個人差は MDR1 遺伝子多型と関連があると示唆された。

A. 研究目的

カルシニューリンを介したT細胞内 IL-2 転写因子の活性化抑制作用を示すシクロスポリンは特異的かつ強力な免疫抑制作用を持つことから、臓器移植時、乾癬、ネフローゼ症候群、再生不良性貧血、ベーチェット病の臨床治療薬として利用されている。シクロスポリンによる治療効果には個人差が見られ、薬剤治療の有効性が一様でないことが問われている。この個人差をもたらす重要な要因の一つとしてシクロスポリンの薬物動態と薬物感受性に関係する遺伝子の遺伝子多型の関与が示唆される。今回、我々は、CYA の薬剤効果および血中濃度について CYP3A4, CYP3A5, MDR1, シクロフィリン A の遺伝子多型を解析した。

B. 研究方法

横浜市立大学附属病院眼科または北海道大学附属病院眼科にて、ベーチェット病と診断され、CYA を投与されている本病患者 17 人を対象とした。その内、種々の事情により有効性の判定が可能であったのは 7 例、無効は 4 例、効果が未判定なのは 6 例であった。有効性の評価は、内服開始後 6 ヶ月間の発作回数が、内服開始前 6 ヶ月間の半分以下となったものを有効とした。

- ① AUC_{0-4} と C0, C1, C2, C3, C4 の相関を検討した。
- ② CYA 有効群と無効群で AUC_{0-4} および C2 を解析し、これらの値と治療効果との関係を検討した。
- ③ CYA の代謝に関与する CYP3A4 や CYP3A5 遺伝子、吸収・排泄に関する

MDR1 遺伝子、CYA の標的分子であるシクロフィリン A (PPIA) 遺伝子について、それぞれ PCR 法により特異的に増幅後、そのダイレクトシーケンシング (SBT : sequence based typing) により、各対立遺伝子 (アリル) を決定し、CYA 有効群、無効群で比較検討した。

C. 研究結果と考察

- ① AUC0-4 とトラフ値はピアソンの相関係数は 0.666 であった。AUC0-4 と C2 値が最も相関しており、相関係数は 0.896 であり、トラフ値よりも C2 値の方が AUC0-4 と相関していた。
- ② 有効性が評価された 7 例で、AUC0-4 値および C0~C4 の各値ともに CYA の有効性と有意な相関を示すものはなかった。
- ③ CYP3A4 遺伝子には現在 39 個の対立遺伝子 (アリル : allele) が、CYP3A5 遺伝子には 24 個のアリルが知られている。アリルにより CYA の代謝活性に違いがあるものも報告されており、CYA の血中濃度が大きく影響され、CYA の治療効果が変わってくる可能性がある。今回、ベーチェット病患者の CYA 有効群と無効群で CYP3A4 と CYP3A5 遺伝子の多型性を検索したところ、CYP3A4 遺伝子はすべて野生型 (CYP3A4*1A)、CYP3A5 遺伝子もほとんどすべてで野生型 (CYP3A5*3) であり、両群間で相違はみられなかった。すなわち、CYP3A4 や CYP3A5 遺伝子の個人差が CYA の有効性に直接関与している可能性は低いと考えられた。
- ④ MDR1 (multi drug resistance) 遺伝子は ATP のエネルギーを利用して薬剤を細胞外へ排出するポンプの役目を果たしている。MDR1 遺伝子にはイントロンやプロモーター領域も含めると、現在 20 箇所以上の SNP が報告されている。各アリルにより MDR1 の発現量が異なり、薬剤の吸収に違いがあることも示唆されている。今回、MDR1 遺伝子に関してその遺伝

的多型性を調べてみたところ、プロモーター領域では、ハプロタイプ 1/2、2/4、1/5 で AUC0-4 が低値であった。これらに共通の変異は-41a の変異であり、-41a の塩基が A→G へ置換されたアリルを有する患者では AUC0-4 値が有意 (P=0.0002) に低く、CYA の吸収低下が示唆された (図 1)。

遺伝子領域の SNP では、エクソン 26 領域、3435 番目の塩基が C→T へ置換されたアリルを有する患者では AUC0-4 値が高い傾向にあり、CYA の吸収が増加していることが示唆された (図 2)。MDR1 遺伝子エクソン 21 領域、2677 番目の変異では、G/G に対し T/T のタイプは有意に AUC0-4 が高く、また、G を有するタイプ (G/G、G/T) に対し、有しないタイプ (A/A、T/T) は有意に AUC0-4 が高かった (図 2)。これらは既知の報告と同様であった。

- ⑤ MDR1 遺伝子プロモーター領域の遺伝子頻度から約 17% の患者がハプロタイプ 2 を有しており (表 1)、AUC0-4 値の測定が重要と考えられた。
- ⑥ PPIA 遺伝子は 5 つのエクソンから構成されたため、それらのエクソンを特異的に増幅するプライマーを設定して PCR を行い、そのダイレクトシーケンシングにより塩基配列を決定した。その結果、PPIA 遺伝子のエクソン 1 の翻訳開始位置から下流 10 塩基目に多型性が検出されたが、CYA 有効群と無効群で有意差は認められなかった (表 2)。PPIA 遺伝子の多型と治療効果は現時点では有意な相関が見られず、効果の程度などを加味して、他の SNP や対象患者数を増やしさらに検討する必要があると考えている。

D 結論

MDR1 遺伝子プロモーター領域-41a 多型は CYA の吸収低下に、エクソン 26 の 3435 番目の塩基とエクソン 21 領域の 2677 番目塩基多型は CYA の吸収増加に相関していることが示唆された。MDR1 遺伝子プロモーター領域のハプロタイプ 2 は

患者の保有率が高く、有効なシクロスポリン血中濃度を知るために AUC_{0-4} 値の測定が重要と考えられた。

E 健康危険情報
特記事項なし

F 論文発表

1. 大野重昭、北市伸義、南場研一、猪子英俊、水木信久、太田正穂、Bechet 病におけるシクロスポリン治療、免疫の進化、医薬ジャーナル社、印刷中

2. Kobayashi T, Sudo Y, Okamura S, Ohashi S, Uranao F, Hosoi T, Segawa K, Mizuki N, Ota M. Monozygotic twins concordant for intestinal Behçet's disease. J Gastroenterology, 40:421-425, 2005.

G 知的財産権の出願・特許状況
なし

図1 MDR1遺伝子のエクソン領域の SNPとシクロスポリン AUC_{0-4} の関係

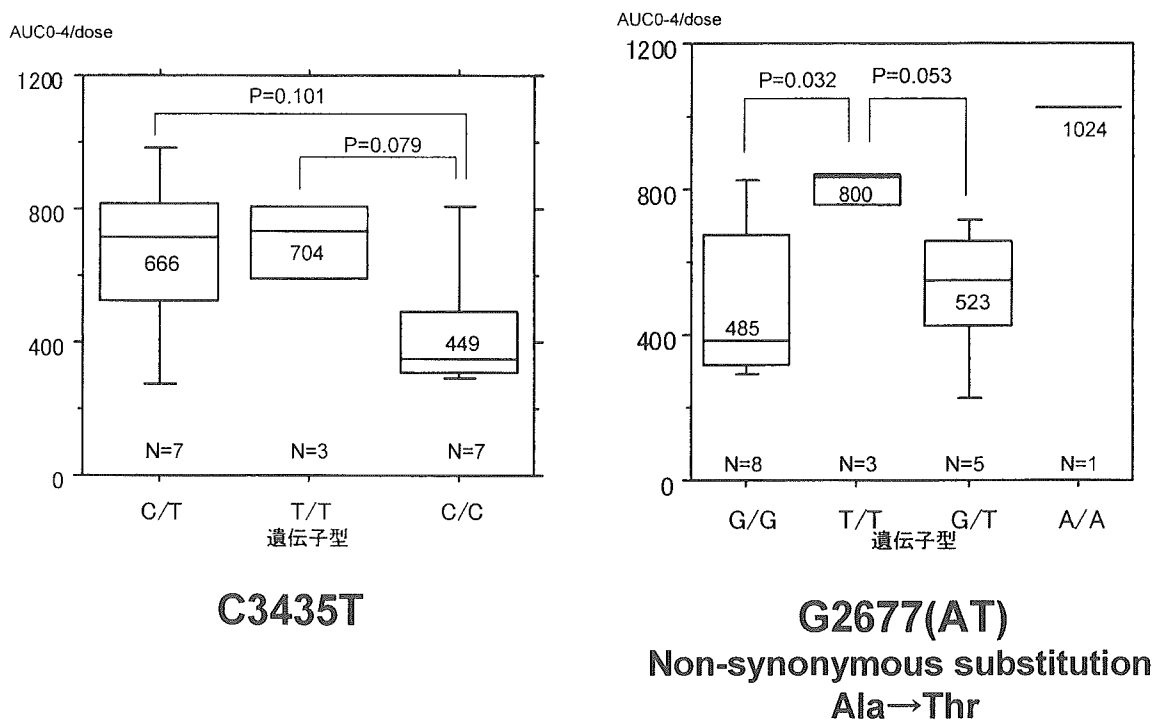
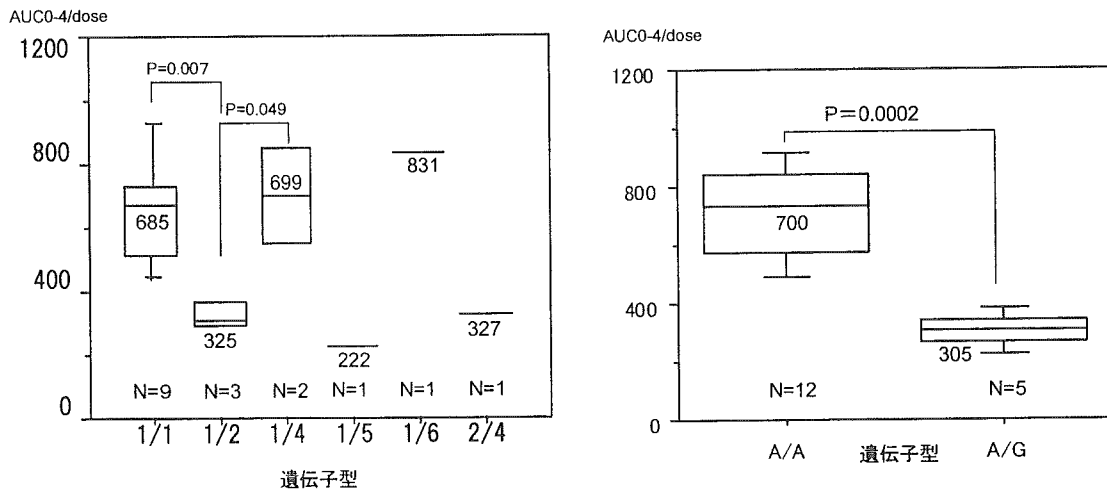


図2 MDR1遺伝子のプロモーター領域のSNPとシクロスポリンAUC0-4の関係



プロモーターハプロタイプとAUC0-4

A-41aGとAUC0-4

表1 ベーチェット病患者のMDR1遺伝子プロモーター領域の多型 (N=34)

ハプロタイプ	N	遺伝子頻度
1	48	0.706
2	6	0.088
4	9	0.132
5	3	0.044
6	2	0.029

ハプロタイプ2を有していると考えられる患者は約17%

表2 ベーチェット病患者のPPIA遺伝子多型

患者	効果	AUC0-4	A-10G
B003	有効	4231	A/G
B008	有効	1463	G/G
B038	有効	2521	G/G
B250	有効	1637	G/G
B528	有効	2458	G/G
B530	有効	3579	A/G
B573	有効	1429	A/G
B305	無効	2253	A/A
B513	無効	1108	A/G
B521	無効	2528	G/G
B565	無効	1540	G/G