

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のシクロスポリン感受性に関する研究

分担研究者 水木 信久 横浜市立大学視覚器病態学 教授

研究要旨 ベーチェット病は再発性難治性の炎症性眼疾患であり、未だ治療法は確立されておらず時には失明に至る。近年、本疾患に対しシクロスポリン(CYA：ネオーラル®)が使用される機会が増加しているが、本薬剤の感受性には個人差があり、治療効果に違いがみられることも報告されている。そこで私達は CYA 内服中のベーチェット病患者を対象として、CYA 有効群と無効群における AUC (area under the curve)0-4 を測定することにより、CYA 感受性の相違を検討した。CYA 内服中のベーチェット病患者 17 例において、CYA 血中濃度を投与 0, 1, 2, 3, 4 時間後に測定し、AUC (area under the curve)0-4 を算出した。CYA 有効群と無効群で AUC0-4 を比較検討し、治療効果との関係を解析した。その結果、AUC0-4 が高値の症例で治療効果が高い傾向がみられたが、症例数が少なく有意な相関は得られなかった。また、AUC0-4 と治療効果が相関しない症例も存在しており、CYA の血中動態以外にも個人の薬剤感受性を規定する因子があることが示唆された。投与 0, 1, 2, 3, 4 時間後の各血中濃度と AUC0-4 の相関では、他の疾患同様、内服 2 時間後の血中濃度 (C2 値) が AUC0-4 と最も強く相関していた。

A. 研究目的

CYA は投与量が同じでも個人間で血中濃度が異なるため、モニタリングが必要である。現在まで CYA の血中濃度のモニタリングの指標として、トラフ値（投薬直前血中濃度：C0 値）が広く使用されてきた。トラフ値は再現性の高いパラメーターであり、治療効果および安全性のよい指標であるが、一部の症例においてはトラフ値と効果との相関性が低く、また、トラフ値が目標範囲内であっても十分な免疫抑制効果が得られない症例も散見される。薬物動態学的に最も信頼されるモニタリング法は AUC (area under the curve) 0-12 モニタリングであるが、この方法は 1 日に頻回（13 回）の採血が必要であり、患者の負担も大きく、コストも高い。AUC0-4 モニタリングは AUC0-12 モニタリングに比し採血回数、コストが減少するうえ、AUC0-12 をよく反映しているため、トラフ値より治療効果と安全性の指標として高い精度が得られることが示唆されている。我々は、ベーチェット病患者に対し、適切な CYA 投与量の調節を行うために、本病患者に対し AUC0-4 モニタリングを行い、CYA 治療有効例と無効例における AUC0-4 の差を比較検討することにより、患者間の CYA 感受性の個人差を検索した。

また、CYA 内服 0, 1, 2, 3, 4 時間後の各 CYA 血中濃度と AUC0-4 との相関を比較し、トラフ値より信頼性の高い簡便なモニタリング法について検討した。

B. 研究方法

眼科外来にて CYA 内服直前、内服後 1 時間後、2 時間後、3 時間後、4 時間後の計 5 回、CYA 血中濃度（それぞれ C0 値：トラフ値、C1 値、C2 値、C3 値、C4 値）を測定し、AUC0-4 を算出した。CYA 内服前後半年間の発作回数を比較し、CYA 内服後の発作回数が CYA 内服前の発作回数の半分以下のものを有効とし、CYA 有効群、無効群間で AUC0-4 を比較検討した。同時に肝機能、腎機能、CK などの血液検査データの変動およびその他歯肉肥厚、高血圧、神経症状などの副作用と AUC0-4 の関係もあわせて検討した。また、トラフ値、C1 値、C2 値、C3 値、C4 値と AUC0-4 との相関を比較し、簡便でトラフ値よりも信頼性の高いモニタリング法について検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は大学倫理委員会での審査を経て許可されたものである。対象患者には研究の目的、研究の期間と方法、予測される効果及び危険性、協力しない場合であっても不利益を受けない

こと、研究への参加に同意した場合であっても、随時これを撤回できること等を十分説明し、インフォームドコンセントを得た上で研究に参加していただく。得られた個人情報 は連結匿名化の上、厳重に管理されている。

C. 研究結果

現在までに 17 症例で AUC0-4 の測定を行った。症例の内訳は男性 13 例、女性 4 例、発症時の平均年齢は 34.5 ± 7.2 歳であった。病型は完全型が 5 例、不全型が 12 例であった。HLA-B51 陽性は 9 例、陰性は 4 例、未検は 4 例であった。

CYA 有効例が 9 例、無効例が 6 例、判定不能例が 1 例であった。CYA 有効例の AUC0-4 の平均は $2345 \text{ ng} \cdot \text{hr}/\text{ml}$ 、CYA 無効例の AUC0-4 の平均は $1714 \text{ ng} \cdot \text{hr}/\text{ml}$ であった。

有効例では AUC0-4 が $1000 \sim 2000 \text{ ng} \cdot \text{hr}/\text{ml}$ が 44.4%、 $2000 \sim 3000 \text{ ng} \cdot \text{hr}/\text{ml}$ が 55.6%、 $3000 \text{ ng} \cdot \text{hr}/\text{ml}$ 以上が 22, 2%であった。無効例では AUC0-4 が $1000 \sim 2000 \text{ ng} \cdot \text{hr}/\text{ml}$ が 33.3%、 $2000 \sim 3000 \text{ ng} \cdot \text{hr}/\text{ml}$ が 50.0%、 $3000 \text{ ng} \cdot \text{hr}/\text{ml}$ 以上は 0 %であった (図 1)。CYA 有効群では CYA 無効群より AUC0-4 値が高い傾向がみられ、AUC0-4 が高値の症例には有効例が多かった。しかしながら、症例数が少なく、統計学的に有意差は認められなかった。副作用の比較では CYA 有効例で軽度の腎障害 1 例、軽度の肝障害 1 例、神経ベーチェット 1 例を認めたが症例数が少なく、AUC0-4 との関係は不明であった。

AUC0-4 と各測定値における相関 (ピアソン相関係数) は、トラフ値 (C0 値) で 0.664、C1 値で 0.794、C2 値で 0.896、C3 値で 0.862、C4 値で 0.814 であり、C2 値が AUC0-4 と最も強く相関していた。

D. 考察

ベーチェット病の治療効果と AUC0-4 の関係については、有効例で AUC0-4 が高値の傾向がみられたが、症例数が少なく、統計学的に有意な相関は得られなかった。今後さらに症例数を増やして検討する必要があると考えられた。また、AUC0-4 のみでは治療効果を判定できない症例が存在したことから、CYA の血中動態以外にも個人の薬剤感受性を規定する因子があることが示唆された。

AUC0-4 と各測定値 (C0~C4 値) との関係では、C2 値が最も強く AUC0-4 と相関し、ベーチェット病でも他の疾患と同様に、C2 値が

CYA 血中濃度のモニタリングとして有用であると考えられた。

E. 結論

ベーチェット病の CYA の血中濃度モニタリングにおいて、C2 値は CYA の血中動態をトラフ値よりもよく反映しており、CYA モニタリングとして有用であると考えられた。AUC0-4 は CYA 有効例で無効例よりも高い傾向にあったが、統計学的な有意差は得られなかった。今後さらに対象症例を増加して検討する必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

特記事項なし

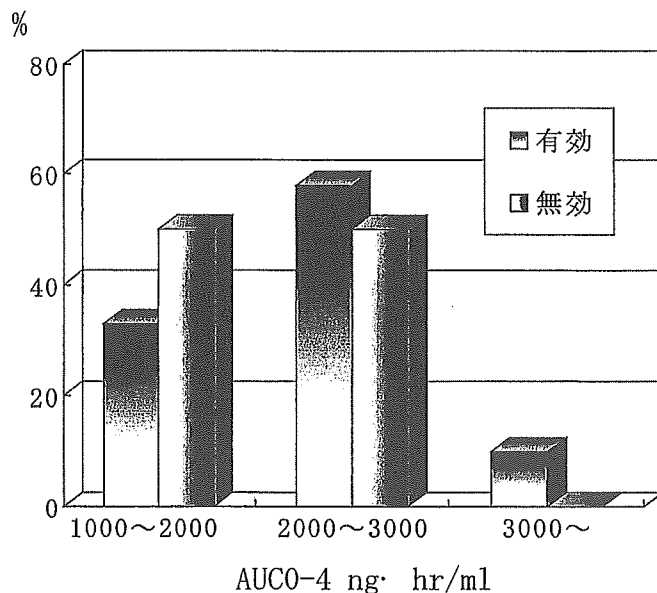
G. 研究発表

特記事項なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記事項なし

図 1



分担研究報告書

難治性ベーチェット病にインフリキシマブを長期使用した1症例

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：高本光子	東京都老人医療センター眼科
蕪城俊克	東京大学医学部附属病院眼科
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

【緒言】ベーチェット病(B病)に対する抗TNF- α 抗体製剤インフリキシマブ®(T剤)の長期使用の報告はない。我々は、T剤を長期使用した難治性B病の症例を経験したので報告する。【症例】症例は25才男性の不全型B病。20才時発症し、コルヒチン1mgとシクロスポリン250mgの内服でも眼発作を抑制できなかった。2001年東大眼科を受診しT剤の治験を開始した。10mg/kgを0、2、6週目、以後8週毎に46週目まで投与した。この間の発作は3回だったが治験終了後眼発作が再発したため、T剤5mg/kgを8週毎に、現在はシクロスポリン150mgとT剤5mg/kg月1回投与で眼炎症はコントロールされている。また、現在までにT剤の投与は合計40回を越えているが、重篤な副作用も認めていない。【考察】T剤投与により約4年間、眼発作がコントロールされている難治性B病の1症例を報告した。

A. 背景と目的

インフリキシマブは、代表的な炎症性サイトカインであるTNF- α に対するキメラ型モノクローナル抗体であり、TNF- α の作用を抑制する作用を持つ。現在、関節リウマチやクローン病、などといった炎症性疾患に対し、世界80カ国以上の国で使用されている。日本においても2002年にクローン病、2003年に関節リウマチに対する使用が厚生労働省で認可されている。

ベーチェット病においても、ぶどう膜炎の活動性とTNF- α には関連があることが知られており、TNF- α をターゲットとした治療が考えられるようになった。ベーチェット病に対してイ

ンフリキシマブを使用した報告は、ぶどう膜炎発作がおきた際にインフリキシマブを投与したところ、炎症が速やかに沈静化したというのが散見される(1)(2)(3)。一方、眼発作抑制療法としての使用に関しては、既存の治療薬でコントロール不能の症例を対象に、一定期間で4回投与を行い、その間の発作回数が、投与前の観察期間での発作回数と比較し減少したと報告している(4)(5)。しかし、ベーチェット病は炎症の増悪、寛解を繰り返し、慢性の経過をたどる疾患である。病勢のコントロールのために、薬剤の投与は長期間にわたることが予想されるが、現在のところ、ベーチェット病に対し

インフリキシマブを長期間使用し続けた報告はない。

今回我々は、既存の治療薬でコントロール不能であった難治性のベーチェット病患者に対し、治験終了後も定期的にインフリキシマブを投与し続け、約4年間、眼発作をコントロールできた症例を経験したので報告する。

B. 症例

症例は25才男性。1996年、20才時に不全型ベーチェット病の診断を受けた。発症時より、網膜浸出斑や出血、網膜血管炎、硝子体混濁などを認めるぶどう膜炎発作を繰り返していた。順次内服薬を追加し、1999～2000年にはコルヒチン1mg、シクロスポリン5mg/kgBW、プレドニゾロン10mgの内服をしていたが、1ヶ月に1、2回程度の眼発作を起こしていた。2000年9月からは他院で、インフリキシマブの治験に参加し、0、2、6、10週目のプロトコルで4回、投与を受けていた。この治験が終了してから次に東大病院でインフリキシマブを投与するまでの9ヶ月間の間に、9回の網膜ぶどう膜炎発作を起こしていた。2001年6月には、インフリキシマブの長期試験に参加するため、東大眼科を受診した。この時の眼所見は、 $V_d = (0.15p \times S - 2.25D = C - 0.25DA150^\circ)$ 、 $V_s = (0.08 \times S - 3.75D = C - 1.5DA170^\circ)$ 、両眼眼圧8mmHg、両眼、前房内セル(±)、フレア(±)。右眼はIOL挿入眼、YAG後囊切開術後。左眼には皮質白内障、一部瞳孔縁に虹彩後癒着を認めていた。右眼眼底には、限局した硝子体混濁を3、4個、白鞘化した網膜血管を認め、黄斑部網膜は萎縮、視神経乳頭は蒼白化していた。左眼は白内障のため眼底は透見困難だったが、黄斑部網膜の萎縮と視神経乳頭の蒼白化を認めた。同時期の全身所見では、血算において、白血球が13800/ μ lと高め、また、生化学検査ではGOT 47IU/l、

GPT 63IU/lと肝酵素がやや高かったが、その前後1ヶ月の採血では正常値であった。その他、腎機能などに異常値はなかった。抗核抗体は陰性、抗ds-DNAIgM抗体41IU/ml、抗ds-DNAIgG抗体<5IU/mlであった。胸部レントゲン撮影では異常所見はなかった。ベーチェット病以外に特記すべき既往歴はなかった。

C. 結果

2001年8月より、臨床試験に参加し、インフリキシマブ10mg/kgの投与を8回行った。インフリキシマブの投与時期及び投与量、ぶどう膜炎発作の時期は、図1に示すとおりである。なお、発作は、硝子体混濁の増加や、新たな網膜浸出斑や出血が起きたときを示しており、前房内のセルやフレアのみの場合を含めていない。他院で4回投与の臨床試験に参加した後、2回目に参加した臨床試験でインフリキシマブを投与するまでの9ヶ月の間に9回の発作を起こしていたが、2001年8月に開始した臨床試験では、試験期間約12ヶ月の間に、3回の発作を起こしたのみであった。この治験終了後も患者さん本人が抗体投与を受けることを強く希望されたので、10mg/kgBWのインフリキシマブを、2ヶ月に1回の割合で投与を続けた。2003年2月には、下痢と易疲労感を自覚し、同時期の採血で血清CPK値の上昇を認め、コルヒチンの内服を中止した、ということがあった。その後、CPK値の異常や、ミオパチー症状などは認めていない。2003年8月からは渡米し、渡米先の病院で月に一回、5mg/kgBWのインフリキシマブを継続投与されていた。2004年3月に帰国後も同様の量を継続投与している。月一回の投与中は前房内にセルが認められたことは2、3回あったが、眼底に変化を起こすような発作はなかった。渡米中の2004年2月に、一度、内服薬をすべて中止したが、帰国後の4

月からはシクロスポリン 150mg のみ再開している。2005 年 11 月の眼所見は、 $V_d = (0.2 \times S - 4.0D = C - 1.0DA115^\circ)$ 、 $V_s = (0.1 \times S - 5.0D)$ 、 $T_d = 9$ 、 $T_s = 10\text{mmHg}$ 、両眼前房内セル(-)、フレア(-)、IOL 挿入眼、YAG 後囊切開術後。両眼底には、黄斑部網膜の萎縮を認め、視神経乳頭は蒼白化、白鞘化した網膜血管を認めた。活動性のある炎症所見はなく、ぶどう膜炎は沈静化していた。全身所見では 10 月に行った採血で、白血球が $9300/\mu\text{l}$ とやや高めという以外は血算、肝機能、腎機能に異常はなかった。抗核抗体は陽性 (Homogen320 倍)、抗 dsDNAIgG 抗体 14IU/ml、抗 ss-DNAIgG 抗体 10IU/ml と陽性だったが、ループス様症状は認めていない。胸部レントゲン撮影でも異常を認めていない。

2000 年 9 月にインフリキシマブを投与し始めてから現在まで、2003 年にミオパチー様の症状を認めた以外は、全身的に副作用と考えられるような症状は認めていない。2001 年 8 月からは 1~2 ヶ月の間隔で、1 回に 5~10mg/kgBW の量のインフリキシマブを、現在までの約 4 年間で、40 回以上投与した。この間のぶどう膜炎発作は 7 回であり、特に 2003 年 7 月の発作を最後に、寛解状態である。

D. 考察

ベーチェット病の眼発作抑制療法としての、インフリキシマブの投与の報告は、海外では 14 週間で 4 回投与したという報告があるのみである。本邦においては、4 回投与の短期臨床試験と、8 回投与の長期臨床試験がおこなわれ、この本邦での長期試験がもっとも長期間、インフリキシマブを投与した臨床試験と考えられる。さらに今回の症例では治験終了後も患者さんの強い希望によりインフリキシマブを使用し続けており、おそらくわれわれの調べる限り、最も長期間にわたりベーチェット病に投与

した貴重な症例と考えられる。本症例でベーチェット病眼症がコントロールされ続けていることから、今後、既存の治療でコントロール不能の症例も、インフリキシマブの長期投与によって、眼症を長期間コントロールできる可能性が示されたものとする。

E. 結論

インフリキシマブの定期的な投与により、長期間眼症状をコントロールできた難治性ベーチェット病の 1 例であった。今回の症例は、あくまで 1 例報告であり、長期使用の安全性と、有効性について今後も検討が必要であると考えられた。

参考文献

- 1) Sfikakis PP, Theodosiadis PG, Katsiari CG, et al. Effect of infliximab on sight-threatening panuveitis in Behcet's disease. *Lancet* 2001;358:295-296.
- 2) Annie Joseph, Dev Raj, Harminder S. Dua, et al. Infliximab in the treatment of refractory posterior uveitis. *Ophthalmology* 2003;110:1449-1453.
- 3) E W Lindstedt, G S Baarsma, R W A Kuijpers, et al. Anti-TNF- α therapy for sight threatening uveitis. *Br J Ophthalmol* 2005;89:533-536.
- 4) Tugal-Tutkun I, Mudun A, Urgancioglu M, et al. Efficacy of infliximab in the treatment of uveitis that is resistant to treatment with the combination of azathioprine, cyclosporine, and corticosteroids in Behcet's disease. *Arthritis Rheum* 2005 ;52:2478-2484.
- 5) Ohno S, Nakamura S, Hori S, et al. Efficacy, safety, and pharmacokinetics of multiple administration of infliximab in Behcet's

disease with refractory uveoretinitis. J Rheumatol 2004;31:1362-1368.

- 6) Ando K, Fujino Y, Hijikata K et al: Epidemiological features and visual prognosis of Behçet's disease. Jpn J Ophthalmol 43:312-317.1999.

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

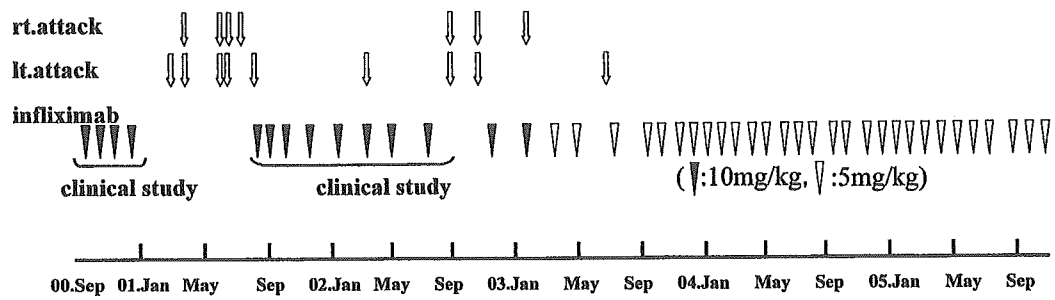
16 年度研究業績。pp65-69. 2005.

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

図1. 経過表



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

抗炎症作用が知られていない既存薬剤のぶどう膜炎に対する有効性に関する研究

分担研究者 大野重昭（北海道大学視覚器病学分野）
研究協力者 北市伸義，北明大洲，北村 瑞，宮崎晶子，南場研一，
岩渕和也，小野江和則

研究要旨

目的：新薬開発は巨額の費用と長い年月を必要とする。しかし、既存薬剤の作用機序の解析が進むにつれ、新たな臨床効果が再発見されることがある。本研究の目的は、眼炎症との関係が知られていない既存薬剤の中からぶどう膜炎に有効性があるものを探し出し、安価で速やかな実用化への可能性を探ることである。

方法：ヒト内因性ぶどう膜炎モデルである実験的自己免疫性網膜ぶどう膜炎（EAU）を C57BL/6 マウスに惹起した。このモデルに ①胃粘膜保護薬 Geranylgeranylacetone (GGA)、または ②高血圧・心不全治療薬 Losartan-K を経口投与して重症度、発症日を検討した。

結果：①免疫後 2 1 日目の組織学的重症度は対照群では 1.63 ± 0.18 、GGA 投与群では 0.33 ± 0.17 であった ($P=0.027$)。また、GGA 投与群では熱ショック蛋白 (HSP) 70 が増加していた。

②対照群の EAU 発症日は免疫後 14.06 ± 1.70 日であったのに対し、Losartan-K 投与群の発症日は免疫後 15.72 ± 1.87 日であった ($P=0.018$)。

まとめ：我々は過去の世界中の発表論文を検討し、これまでベテネット病とも眼科領域とも無関係と考えられてきた膨大な既存薬剤の中から、ぶどう膜炎治療に有効な可能性がある薬剤をピックアップし、動物モデルでその有用性を示した。

A. 研究目的

新薬開発は巨額の費用と長い年月を必要とする。しかし、科学の進歩により既存薬剤の作用機序の解析が進み、開発時には予想しなかった新たな臨床効果が再発見されることがある。例えば解熱鎮痛薬として 19 世紀に開発されたアスピリンは、のちに抗血小板凝固作用が発見され、今日では主として後者の目的で広く使用されている。本研究の目的は、眼炎症との関係が知られていない既存薬

剤の中からぶどう膜炎治療に効果を有するものを探し出し、安価で速やかに実用化させる可能性を探ることである。

B. 研究方法

<候補薬剤の選択> 現在世界中で用いられている薬剤に関する基礎実験や臨床データの多くは英文原著論文として公表されている。我々は米国国立バイオテクノロジー情報センター (NCBI) のデータベース等を検

索して眼科領域、炎症・免疫学領域以外で使用される薬剤に関する膨大な原著論文を検討して、その報告内容や作用機序からぶどう膜炎に対する効果を有する可能性がある、以下の二つの薬剤に注目した。

- ① 胃粘膜保護薬 Geranylgeranylacetone
- ② 高血圧・心不全治療薬 Losartan-K

<実験モデル> ベーチェット病などヒト内因性ぶどう膜炎の動物モデルである実験的自己免疫性網膜ぶどう膜炎 (EAU) を用いた。C57BL/6 マウスに視細胞間結合レチノイド蛋白と完全フロインドアジュバント、百日咳菌を注射して EAU を惹起し、その重症度、発症日を検討した。

薬剤の投与方法は以下の通りである。

- ① Geranylgeranylacetone (GGA) :
500mg/kg を免疫前一回経口投与
- ② Losartan-K : 25mg/kg を連日 21 日間経口投与

C. 研究結果

- ① 免疫後 21 日目の組織学的重症度は対照群では 1.63 ± 0.18 (平均 \pm 標準誤差)、GGA 投与群では 0.33 ± 0.17 ($P=0.027$, Mann-Whitney U test) と投与群で有意に軽症化した。また、GGA 投与群では

免疫後眼球の熱ショック蛋白 (HSP) 70 発現が亢進していた。

- ② 最終重症度は両群間で差がなかったが、対照群の EAU 発症日は免疫後 14.06 ± 1.70 日であったのに対し、Losartan-K 投与群の発症日は免疫後 15.72 ± 1.87 日 ($P=0.018$) と発症が有意に遅延した。

D. 結論

これまでベーチェット病とも眼科領域とも無関係と考えられてきた既存薬剤の中から、ぶどう膜炎治療に奏功する可能性がある薬剤をピックアップし、動物モデルでその効果を示した。今後さらに両薬剤の作用機序などの検討を進めるとともに、引き続き他の候補薬剤の探索も継続する予定である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

論文発表 なし

学会発表 なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

ラット experimental autoimmune uveoretinitis における
human cationic antimicrobial protein 18 の治療効果

分担研究者 大野重昭（北海道大学視覚器病学分野）
研究協力者 大神一浩、白取謙治、鈴木由香利、
金学海、北市伸義（北海道大学視覚器病学分野）
磯貝恵美子（北海道医療大学）

研究要旨

目的：Human cationic antimicrobial protein 18 (hCAP18) は好中球由来の塩基性タンパクである。hCAP18 の C 末端側の 27 個のアミノ酸からなるペプチドは LPS 結合能があり、エンドトキシンショック敗血症の治療に有効であることが知られている。これまでに hCAP18 が急性ぶどう膜炎モデルであるエンドトキシン誘発ぶどう膜炎を、濃度依存的に抑制することを報告した。今回は hCAP18 の抗炎症作用を詳細に検討するため、experimental autoimmune uveoretinitis(EAU)における hCAP18 の治療効果を検討した。

方法：ルイスラットを R16 ペプチドで免疫し、EAU を作成した。hCAP18 は用時調製し、免疫後から 7 日間 10、50、100 μ g をそれぞれ 1 日 1 回尾静脈内投与した。無治療群には溶媒である PBS を同じタイムスケジュールで投与した。免疫 7、10、14、21 および 28 日後に臨床的評価および病理学的評価を行い、hCAP18 の治療効果を検討した。

結果：無治療群は免疫 7 日後から、虹彩・毛様体、硝子体および網膜脈絡膜に浸潤細胞がみられ、14 日後にピークになった。一方、無治療群と比較して hCAP18 の 50 および 100 μ g 群は EAU を有意に抑制した。

考察：hCAP18 は EIU だけではなく、EAU も同様に抑制した。したがって、hCAP18 は眼炎症に対する消炎治療効果を有する可能性が示唆された。

A. 研究目的

Human cationic antimicrobial protein 18(hCAP18)は好中球由来の塩基性タンパクである。hCAP18のC末端側の27個のアミノ酸からなるペプチドにはLPS結合能があり、エンドトキシンショック敗血症の治療に有効であることが知られている。これまでにhCAP18はエンドトキシン誘発ぶどう膜炎を濃度相関的に抑制することを報告した¹。hCAP18の抗炎症作用をさらに検討するために、慢性的な網膜・脈絡膜炎モデルであるexperimental autoimmune uveoretinitis (EAU)を用いてその治療効果を検討したので報告する。

B. 研究方法

1.EAU モデルの作成

5 週齢雄性ルイスラットに R16 ペプチドを投与し、EAU を作成した。

2. hCAP18 の投与期間

hCAP18 は 10、50 または 100 μ g を免疫後から 7 日間、1 日 1 回尾静脈内投与した。無治療群は溶媒である PBS を 0.1ml/ラットで同じタイムスケジュールにて投与した。1 群 28 匹とした。

3.治療の評価

治療の評価は免疫 7、10、14、21 および 28 日後に臨床的スコア² および病理学的スコア³によって評価した。病理学的スコアについて各群ともに無作為に 5 匹づつ選び、

エーテルにて過剰麻酔を行った後に眼球を摘出し、常法により HE 染色を行った。

4.T 細胞数の測定

免疫 7 日後に各群 5 匹ずつ所属リンパ節を摘出し、常法により T 細胞を集めた。T 細胞を 96 ウェルに 4×10^4 個になるように調整し、R16 ペプチド (10 μ M) と hCAP18 (1、50、100 μ g/ml) を添加し、2% ラット血清を含む RPMI1640 で 48 時間培養した。次に、³H-thymidine をさらに加えて 16 時間培養した。結果は無治療群の CPM を 100% としてその割合で示した。

(倫理面への配慮)

本試験は北海道大学医学部動物実験委員会の承認を得て、予め計画を立て必要最小限の動物を用いることとし、動物に苦痛を与えないように注意を払いながら実験を行った。

C. 研究結果

1. 臨床的評価

無治療群は免疫 10 日後から前房内に炎症細胞がみられ、14 日後に炎症は最も強く炎症症状がみられた。一方、hCAP18 は濃度相関的に炎症は抑制され、特に 50 および 100 μ g 群では無治療群と比較して顕著な抑制がみられた。

2. 病理学的評価

免疫 14 日後の無治療群の虹彩、毛様体、硝子体および網膜には多数の炎症細胞がみられた。特に網膜では、photoreceptor 層の障害が強くみられた。一方、hCAP18 では無治療群と比較して、濃度相関的に炎症が減弱していた。特に、100 μ g hCAP 群では虹彩、毛様体、硝子体および網膜にはわずかな炎症細胞がみられるだけであった。

3.T 細胞数への影響

無治療群と比較して、hCAP18 群では濃度相関的に減少がみられた。特に、hCAP18 50 および 100 μ g 群では無治療群よりそれぞれ 20%、60% と T 細胞数は有意に減少した。

D. 考察

hCAP18 は EIU だけではなく、EAU も同様に抑制した。したがって、hCAP18 は眼炎症に対する消炎治療効果を有する可能性が示唆された。その作用機序は所属リンパ節での T 細胞の産生抑制であると思われる。

しかしながら、試験期間中を通じて、hCAP18 の投与により、一部の動物に体重増加抑制がみられた。また、hCAP18 は LPS 結合能を有するため、EAU を作成するために、追加免疫として使用された百日咳菌に影響をおよぼしたことは否定できない。そのために、今後投与ルートおよび投与量の変更、検討するモデルの選択等が課題となる。

E. 参考文献

1. Ohgami, K, Ilieva, IB, Shiratori, K, Isogai, E, Yoshida, K, Kotake, S, Nishida, T, Mizuki, N, Ohno, S (2003) Effect of human cationic antimicrobial protein 18 Peptide on endotoxin-induced uveitis in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 4412-8
2. de Smet, MD, Bitar, G, Roberge, FG, Gery, I, Nussenblatt, RB (1993) Human S-antigen: presence of multiple immunogenic and immunopathogenic sites in the Lewis rat. *J Autoimmun* 6: 587-99.
3. Wildner, G, Thurau, SR (1994) Cross-reactivity between an HLA-B27-derived peptide and a retinal autoantigen peptide: a clue to major histocompatibility complex association with autoimmune disease. *Eur J Immunol* 24: 2579-85.

研究発表

1. Jin XH, Ohgami K, Shiratori K, Suzuki Y, Koyama Y, Yoshida K, Ilieva I, Tanaka T, Onoe K, Ohno S; Effects of blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.) extract on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo. ; *Exp Eye Res.* 2005(in press)
2. Suzuki Y, Ohgami K, Shiratori K, Jin XH, Ilieva I, Koyama Y, Yazawa K, Yoshida K, Kase S, Ohno S; Suppressive effect of astaxanthin against rat endotoxin-induced uveitis by inhibiting the NF- κ B signaling pathway. ; *Exp Eye Res.* 2005 (in press)
3. Shiratori K, Ohgami K, Ilieva I, Jin XH, Koyama Y, Miyashita K, Yoshida K, Kase S, Ohno S; Effects of fucoxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo. ; *Exp Eye Res.* 81:422-428, 2005
4. Shiratori K, Ohgami K, Ilieva I, Jin XE,

Yoshida K, Kase S, Ohno S ; The Effects of naringin and naringenin on endotoxin-induced uveitis. J Ocular Pharm Therap 21:298-304, 2005

5. Ohgami K, Ilieva I, Shiratori K, Koyama Y, Jin XH, Yoshida K, Kase S, Kitaichi N, Suzuki Y, Tanaka T, Ohno S ; Anti-inflammatory effects of aronia extract on rat endotoxin-induced uveitis. Invest Ophthalmol Vis Sci. 46 : 275-281, 2005

2 学会発表

1. Ohgami K, Shiratori K, Jin X, and **Ohno S**; Suppressive effect of astaxanthin on endotoxin-induced uveitis in rats. International Ocular Inflammation Society May,19-21, 2005, Granada (Spain)
2. Shiratori K, Ohgami K, Suzuki Y and **Ohno S**; Effects of fucoxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo. International Ocular Inflammation Society May,19-21, 2005, Granada (Spain)
3. Suzuki Y, Ohgami K, Shiratori K and **Ohno S**; Anti-inflammatory effects of aronia extract on rat endotoxin-induced uveitis. International Ocular Inflammation Society May,19-21, 2005, Granada (Spain)
4. Jin X, Ohgami K, Shiratori K and **Ohno S**; Effect of human cationic antimicrobial protein 18 peptide on endotoxin-induced uveitis in rats. International Ocular Inflammation Society May,19-21, 2005, Granada (Spain)

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

NF- κ B シグナル経路阻害によるラットエンドトキシン誘発ぶどう膜炎に対する
アスタキサンチンの抑制効果

分担研究者 大野重昭（北海道大学視覚器病学分野）
研究協力者 鈴木由香利 大神一浩 白取謙治 金学海（北海道大学視覚器病学分野）

研究要旨

目的；アスタキサンチン（AST）はカロテノイドの一種であり、抗酸化作用をはじめとする種々の薬理作用が報告されている。これまでに我々は、AST が PGE2、NO 合成経路を抑制することでラットエンドトキシン誘発ぶどう膜炎(EIU)を抑制することを報告した。近年、サイトカインネットワークの上流にある NF- κ B 活性を、in vitro で AST が抑制することが報告されているが、in vivo では証明されていない。そこで、AST の抗炎症作用を明らかにするため、EIU における NF- κ B 活性に及ぼす影響を検討した。

方法；ルイスラットに LPS 投与直後に 1、10、100mg/0.1ml/kg の AST を静脈内投与した。LPS 投与 6、12、24 時間後に前房水を採取し、炎症細胞数、タンパク濃度、NO 濃度、PGE2 濃度および TNF- α 濃度を測定した。また、LPS 投与 3 時間後の NF- κ B の免疫組織化学を行い、虹彩、毛様体の NF- κ B 陽性細胞数を測定した。

結果；LPS 投与 6 時間後から前房水中に炎症細胞が浸潤し、経時的に炎症細胞数、タンパク、NO、PGE2 および TNF- α 濃度は著しく増加した。一方、LPS 群と比較して、AST 群は前房水の炎症細胞数、タンパク濃度、NO 濃度、PGE2 濃度および TNF- α 濃度を 6、12、24 時間ともに有意に減少させた。AST 10、100mg/kg 投与群は虹彩・毛様体における NF- κ B 陽性細胞数を濃度依存的に抑制した。

結論；EIU において、AST は濃度依存的に EIU の炎症因子を抑制した。その抑制は、LPS 投与 6 時間後からみられることから、炎症の初期段階に作用すると思われる。この仮説は、炎症サイトカインネットワークを支配する虹彩・毛様体における NF- κ B 活性を抑制する結果と一致した。

A. 研究目的

アスタキサンチン（AST）はカロテノイド類の一つであり、エビ、カニなどの甲殻類の表面の赤い色素である。これまでに抗酸化作用、抗腫瘍効果、抗ピロリ菌効果などの薬理作用が報告されている。我々はラットエンドトキシン誘発ぶどう膜炎（EIU）モデルにおいて、AST 100mg/kg はプレドニゾン 10mg/kg とほぼ同程度の強い抗炎症作用を示し、その作用機序は NO 産生および PGE2 産生を介した両方の経路を抑制すると報告

した。しかし、AST が炎症のどの時期に影響するのかわからないため、我々は今回ラット EIU モデルにおける AST の治療効果の経時的な影響を検討した。

Nuclear factor κ B (NF- κ B) は p50 と p65 の二つのサブユニットからなるヘテロ二量体で、I κ B と結合し通常は細胞質内に存在する。しかし、TNF- α や外界からのストレスなどによる刺激を受けると I- κ B は遊離し、活性化した NF- κ B が核内に移行する。そして、炎症性サイトカイン遺伝子を転

写し、mRNA は核外へ移行し、炎症性サイトカインを合成することが知られている。そのため、NF- κ B は炎症性サイトカインネットワークを支配していることが知られている。近年、Lee らは *in vitro* において、AST は NF- κ B の活性化を阻害することを報告しているが、*in vivo* での証明はされていない。そこで AST の抗炎症作用のメカニズムをさらに詳細にするために、我々はラット EIU モデルにおける NF- κ B への AST の影響を検討した。

B. 研究方法

ルイスラットの両後足にそれぞれ LPS を 100 μ g 投与した。AST は LPS 投与後すぐに 1、10、100mg/0.4ml/kg の割合で尾静脈内投与した。無治療群は溶媒である 0.1% DMSO を含む PBS を AST と同じスケジュールで投与した。LPS 投与 6、12、24 時間後に前房水を採取した。前房水中の炎症細胞数、タンパク濃度、NO 濃度、TNF- α 濃度、PGE2 濃度を測定した。また、LPS 投与 3 時間後に灌流固定し、NF- κ B の免疫組織化学を行い、虹彩・毛様体の NF- κ B 陽性細胞数を測定した。

C. 研究結果

1. 前房水中の炎症細胞数への影響；LPS 投与 6 時間後からわずかにみられ、12、24 時間と時間とともに増加した。一方、AST は 10、100mg/kg 群ともに LPS 群と比較して 6、12、24 時間後ともいずれの時間においても有意に減少した。また、LPS 投与 12、24 時間後の AST 10、100mg/kg の炎症細胞数はほぼ同程度であった。
2. タンパク濃度への影響；無治療である LPS 群では 6、12、24 時間後と時間が経過するごとに炎症細胞数と同様に前房水中のタンパク濃度は上昇した。一方、AST 群では濃度依存的に有意な減少が見られた。
3. NO 濃度、TNF- α 濃度および PGE2 濃度への影響；これまでと同様に AST 群では濃度依存的に LPS 投与 6 時間後から有意な抑制が見られた。
4. 病理学的検討；正常群では炎症細胞は見

られなかった。LPS 投与群では、投与 24 時間後に多くの炎症細胞が見られた。一方、AST 100mg/kg 群では、炎症細胞は見られたが、LPS 群と比較すると明らかに炎症細胞は減少していた。

5. 虹彩・毛様体における NF- κ B への影響；正常群では NF- κ B が核内には見られなかった。一方、LPS 群では、虹彩・毛様体中に活性化した NF- κ B が核中に多数見られた。AST 100mg/kg 投与により、活性化された NF- κ B 陽性細胞数は明らかに減少した。全視野の虹彩・毛様体の細胞数に対する活性化された NF- κ B 陽性細胞数の割合を算出したところ、LPS 群では約 30%の陽性細胞数が見られたが、AST 群では濃度依存的に有意な減少が見られた。

D. 考察

LPS 投与 6 時間後から前房水中に炎症細胞が浸潤し、経時的に炎症細胞数、タンパク、NO、PGE2 および TNF- α 濃度は著しく増加した。一方、LPS 群と比較して、AST 群では前房水の炎症細胞数、タンパク濃度、NO 濃度、PGE2 濃度および TNF- α 濃度が 6、12、24 時間後ともに有意に減少していた。無治療では、EIU モデルにおいて前房に炎症細胞が見られない、すなわち炎症が見られない時期 (LPS 投与 3 時間後) から、虹彩・毛様体における NF- κ B 陽性細胞は多数見られたのに対し、AST 10、100mg/kg 投与群では有意に抑制された。これまで AST の抗炎症作用機序は NO および PG 合成抑制であると考えられていたが、本研究から炎症性サイトカインネットワークを支配する NF- κ B のシグナル活性を抑制していることを示唆した。また、LPS 投与 6 時間後の前房水中の炎症因子を抑制しており、AST は炎症の初期段階に作用すると思われた。

E. 結論

AST は NF- κ B 依存シグナル経路の抑制により濃度依存的に抗炎症作用を示した。したがって、AST の抗炎症作用機序はこれまで考えられていた NO、PG 合成経路を支配している NF- κ B 依存シグナル経路の抑制であることを *in vivo* においても明らかにし

た。

G. 研究発表

1. 論文発表

a. Suzuki Y, Ohgami K, Shiratori K, Jin XH, Ilieva I, Koyama Y, Yazawa K, Yoshida K, Kase S, and Ohno S; Suppressive effects of astaxanthin against rat endotoxin-induced uveitis by inhibiting the NF- κ B signaling pathway. Experimental Eye Research (in press)

2. 学会発表

a. Ohgami K, Shiratori K, Jin X, and Ohno S; Suppressive effect of astaxanthin on endotoxin-induced uveitis in rats. International Ocular Inflammation Society May,19-21, 2005, Granada (Spain)

b. Shiratori K, Ohgami K, Suzuki Y and Ohno S; Effects of fucoxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo. International Ocular Inflammation Society May,19-21, 2005, Granada (Spain)

c. Suzuki Y, Ohgami K, Shiratori K and Ohno S; Anti-inflammatory effects of aronia extract on rat endotoxin-induced uveitis. International Ocular Inflammation Society May,19-21, 2005, Granada (Spain)

d. Jin X, Ohgami K, Shiratori K and Ohno S; Effect of human cationic antimicrobial protein 18 peptide on endotoxin-induced uveitis in rats. International Ocular Inflammation Society May,19-21, 2005, Granada (Spain)

「ベーチェット病動物モデルを用いた免疫制御療法の標的分子探索」

分担研究者	小野江和則	北海道大学遺伝子病制御研究所免疫生物分野
研究協力者	岩淵 和也	北海道大学遺伝子病制御研究所免疫生物分野
	柳川 芳毅	北海道大学遺伝子病制御研究所免疫生物分野
	北村 瑞	同上・北大大学院医学研究科視覚器病学分野
	水内 一臣	同上・北大大学院医学研究科視覚器病学分野
	北市 伸義	北海道大学大学院医学研究科視覚器病学分野
	南場 研一	北海道大学大学院医学研究科視覚器病学分野
	今 重之	北大遺制研マトリックスメディスン研究部門
	上出 利光	北海道大学遺伝子病制御研究所分子免疫分野
	大野 重昭	北海道大学大学院医学研究科視覚器病学分野

研究要旨 免疫応答を Th1 方向に免疫偏倚させる機能を有するオステポンチン (osteopontin; OPN) の遺伝子標的破壊を行った (OPN^{-/-}) マウスでは、自己免疫性ぶどう膜炎 (EAU) が軽症化する。そこで、EAU モデルにおいて特異抗体投与による OPN の機能阻止を行い、ぶどう膜炎の発症・進展過程について解析した。その結果、発症日が有意に遅延し、また、臨床・病理組織スコアともに、抗体投与群で有意な低下を認めた。したがって、OPN はぶどう膜炎の治療標的となり得ることが示唆された。次に、発症段階、あるいは進展の途中で、Th1 への免疫偏倚を Th2 側に偏向させることで EAU を治療し得るか検討した。 α -galactosylceramide (α -GalCer) をパルスした樹状細胞 (DC) を、異なる toll-like receptor (TLR) リガンド、Pam(3)Cys (TLR1/2)、CpG (TLR9)、で前処置し、NKT 細胞を刺激すると、それぞれ IFN- γ と IL-4 の産生が亢進した。これらのサイトカイン産生パターンは、両リガンドが本来有する特性とは、対称的な傾向を示し、DC の CpG 前処置により NKT 細胞を Th2 方向に偏倚させることが可能であることが判明した。今後、in vivo において、免疫応答全体の Th2 方向への偏倚が誘導されるか、そしてこの結果が EAU 治療に応用可能か、検討する予定である。

A. 研究目的

オステオポンチン (OPN) は、T helper type 1 (Th1) タイプの免疫応答に重要な機能を担っていることが明らかにされつつある。ベーチェット病のマウスモデルである実験的自己免疫性ぶどう膜炎 (EAU) は、Th1 タイプの免疫応答によって、発症するとされている。OPN ノックアウトマウス (OPN^{-/-}) で EAU を誘導すると、平均発症日が遅延し、臨床スコアが低下することを本会議で報告した。OPN の機能障害をぶどう膜炎治療に応用するために、野生型マウスに EAU を誘導し、抗 OPN 抗体を用いて、OPN/OPN レセプター (R) 系の

阻害を図った (目的 1)。ぶどう膜炎の発症段階あるいは進展の途中、Th1 への免疫偏倚を Th2 方向に偏向できれば、EAU の軽症化が可能となると考えられる。樹状細胞 (DC) を異なる toll-like receptor リガンド (TLRL) で前処置し、調節性細胞と考えられる NKT 細胞の DC に対する反応性を調べた。すなわち、 α -GalCer を DC にパルスし、マイコプラズマ由来合成トリパルミトイルリポペプチド (N-Palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-[R]-Cys-[S]-SerI-[S]-Lys (4) trihydrochloride; Pam(3)Cys; TLR1/2 リガンド)、あるいは CpG オリゴデオキシヌクレオチ

ド (CpG: TLR9 リガンド) で前処置をした DC で、NKT 細胞を刺激した場合に、サイトカイン産生パターンが Th1/Th2 のいずれを示すかを解析した (目的 2)。通常の T 細胞培養条件では、Pam(3)Cys は Th2、CpG は Th1 方向に偏倚させることが知られているが、今回は特に NKT 細胞の免疫偏倚を解析した。この背景として、NKT 細胞が自己免疫疾患・感染症・炎症性疾患などにおいて、これらの進展過程に対して促進性にも抑制性にも働き得ることが、明らかにされつつあるからである。

B. 研究方法

1. EAU の誘導法および抗体投与

EAU は 6 週齢の C57BL/6 (B6) ♀ マウスに、ヒト視細胞間レチノイド結合蛋白質ペプチド (hIRBP₁₋₂₀:GPTHFLFQPSLVLDMAKVLLD) 200 μ g をフロインドの完全アジュバントとともに側腹部皮下に免疫し、同日に百日咳毒素 0.1 μ g を腹腔内投与することによって誘導した。翌日より、マウスを散瞳後、眼底を Bonnoscope と Super Field NC Lens (Volk Optical) にて観察し、Thurau らの基準に従って、スコア化 (0~4) した。また、眼球についてはグルタルアルデヒド前固定/フォルマリン後固定の後、パラフィン切片を HE 染色し、病理組織学的評価 (0~4) を行った。ウサギ抗 OPN 中和抗体 M5 は感作前に 400 μ g/マウスで、1 回投与した。対照群には同量のウサギ IgG を投与した。

2. T 細胞増殖反応と上清のサイトカイン測定

hIRBP₁₋₂₀ ペプチド感作 10 日後、所属リンパ節を採取した。T 細胞エンリッチメントカラム (R&D システム) にかけて得たリンパ節由来 T 細胞分画を、30 Gy X 線照射した同系脾細胞 (抗原提示細胞)、抗原ペプチドと 48 時間培養した。T 細胞増殖は ³H-thymidine (Perkin-Elmer ジャパ

ン) 取り込みで、上清中に産生されたサイトカインは ELISA (BD バイオサイエンス) にて、それぞれ測定した。

3. TLR 刺激 DC による NKT 細胞反応性の修飾

BALB/c 脾臓由来の未熟 DC 株 BC1 を R1 メディウム (リコンビナント GM-CSF + NIH3T3 培養上清添加 10% FCS Iscove's Modified Dulbecco's Medium) にて継代した。NKT 細胞と共培養するための DC は、 α -GalCer と 37 $^{\circ}$ C 24 時間培養したのち、PBS、CpG、または Pam(3)Cys と 24 時間培養し、調製した。それぞれを PBS/DC、CpG/DC、または Pam(3)Cys/DC とした。これら DC と、NKT 細胞ソースとしてナイロン非付着性脾細胞を 48 時間共培養し、上清に産生されたサイトカイン産生量を ELISA にて測定した。

4. 倫理面への配慮

動物実験は、北海道大学動物実験委員会にて審議を経た後、許可を得てから実施した。

C. 研究成果

1. 抗 OPN 抗体投与マウスにおけるぶどう膜炎の発症と進展

抗 OPN 抗体 (M5) 投与を行った EAU 誘導 B6 マウスでは、コントロール Ig 投与群と比べ、ぶどう膜炎の発症が遅延し、ピーク時の臨床スコアも有意に低下した (図 1)。スコア 1 を越えたものを発症とした場合、発症率は、実験群で 94% (17/18) で

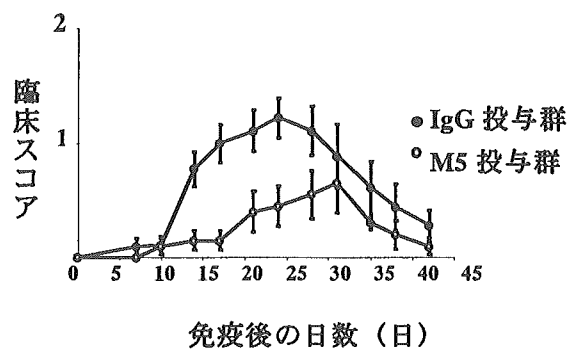


図 1 EAU 誘導後の臨床スコアの経時変化

あったのに対し、対照群では 35% (7/20) と、有意に低下していた ($p < 0.01$)。また、平均最高スコアでも、対照群 1.67 ± 0.90 (平均 \pm 標準偏差) に対し、実験群 0.75 ± 1.12 と有意な低下が認められた ($p < 0.01$)。

軽症化のメカニズムを明らかにするために、抗体投与群より得た脾臓 T 細胞を用いて、抗原特異的増殖反応を行った。予備的ではあるが、M5 投与群で増殖反応の低下を認め、また培養上清中の IFN- γ 、TNF- α 産生量の有意な低下を認めた。

2. DC 機能の TLR リガンドによる修飾と NKT 細胞の応答性の変化

PBS/DC と比較した場合、CpG/DC で刺激した NKT 細胞では IL-4 のみ、Pam(3)Cys/DC 刺激 NKT 細胞では、主として IFN- γ 産生が増強された。また、NKT 細胞のソースとして胸腺細胞を用いた場合にも、同様の結果が得られた。

D. 考察

OPN は、多様な生物活性を有する多機能蛋白質であるが、本体は分子内に GRGDS 配列を持ち、インテグリンと相互作用する細胞外マトリックス蛋白である。トロロニンにより限定分解されて生じる、前半 (NH₂ 側の半分) の末端の cryptic な配列 ¹³¹SLAYGLR は、 $\alpha_9\beta_1$ 、 $\alpha_4\beta_7$ インテグリンと結合し、これらを発現する好中球の病変部への遊走および活性化を惹起する。また、同様に活性化された NKT 細胞からの MIP-2 によっても、好中球の遊走・活性化はさらに進行する。このことが炎症の増悪を招いていると考えられる。したがって、OPN の関与が考えられる炎症性疾患では、特に遊走・活性化に関与する OPN の部位に対する抗体治療の有効性が予想される。SLAYGLR に対する抗体 (M5) の投与によって、Con A 肝炎モデルでは肝障害の軽症化が認められ、また関節炎モデルでもそ

の有効性が確認されている。いずれも Th1 病と考えられる疾患である。本研究でも、M5 が EAU 治療に有効であることが示された。この結果は OPN^{-/-}マウスの成績と一致した。今回有効性が確認されたぶどう膜炎もまた、Th1 病と考えられており、OPN が Th1 免疫偏倚に促進的であることと一致した結果であると考えられた。現在、抗体使用の他に、OPN 発現を低下させる siRNA の *in vivo* 投与の実験も進行中である。

これまでの研究においては、CpG は DC からの IL-12 産生を誘導し、Th1 応答を惹起、一方、Pam(3)Cys は IL-12 の誘導は少なく、IL-10 の誘導が強いため、Th2 方向への偏倚を生じると考えられていた。しかしながら、本研究において、精製された DC 細胞株に α -GalCer をロードし、さらに CpG で処置後に、NKT 細胞を刺激すると、IL-4 産生が亢進することが判明した。この結果は、CpG/DC で NKT 細胞を刺激することにより、Th1/Th2 バランスを Th2 優位にすることが可能であることを示唆するものである。今後は、*in vivo* に CpG/DC を導入し、治療に用いる新規の自己免疫疾患治療法の開発が期待される。これまで表面抗原の検討からは、CpG で CD1d と CD86 の両者の、Pam(3)Cys では、CD86 のみの発現増強が判明しているが、*in vitro* におけるサイトカイン産生パターン逆転のメカニズムの詳細は不明である。この点を明らかにすべく今後検討を続ける必要があると考えられた。

E. 結論

抗 OPN 抗体投与により、EAU の発症が遅延し、臨床スコア値が極期において抑制されていた。従って、ぶどう膜炎の治療標的として、OPN/OPN-R 系への介入が新たに考慮されるべき候補と考えられた。また、DC の TLR を介する刺激により、DC で活性化される NKT 細胞のサイトカイン産生パターンを修飾することが出来た。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yanagawa, Y. and Onoé, K.: CCR7 ligands induce interconnected ruffles of actin filaments in mature dendritic cells that are associated with vigorous endocytosis. *J. Clin. Exp. Hematopathol.* 45: 25-35, 2005.
- 2) Kikuchi, K., Yanagawa, Y. and Onoé, K.: CCR7 Ligands-enhanced phagocytosis of various antigens in mature dendritic cells -Time course and antigen distribution different from phagocytosis in immature dendritic cells. *Microbiol. Immunol.* 49: 535-544, 2005.
- 3) Minami, K., Yanagawa, Y., Iwabuchi, K., Shinohara, N., Harabayashi, T., Nonomura, K. and Onoé, K.: Negative feed back regulation of T helper type 1 (Th1)/Th2 cytokine balance via dendritic cell and natural killer T cell interactions. *Blood* 106: 1685-1693, 2005.
- 4) Mitsuhashi, S., Shima, H., Tanuma, N., Sasa, S., Onoé, K., Ubukata, M., and Kikuchi, K.: Protein phosphatase type 2A, PP2A, is involved in degradation of gp130. *Mol. Cell Biochem.* 269: 183-187, 2005.
- 5) Iijima, N., Yanagawa, Y., Clingan, J.M. and Onoé, K.: CCR7-mediated c-Jun N-terminal kinase activation regulates cell migration in mature dendritic cells. *Int. Immunol.* 17: 1201-1212, 2005.
- 6) Yamada, H., Shimada, S., Morikawa, M., Iwabuchi, K., Kishi, R., Onoé, K. and Minakami, H.: Divergence of natural killer cell receptor and related molecule in the deciduas from sporadic miscarriage with normal chromosome karyotype. *Mol. Hum. Reprod.* 11(6): 451-457, 2005.
- 7) Fukushima, T., Nishihira, J., Yoshiki, T., Iwabuchi, K., Iwabuchi, C., Yamasaki, Y., Kondo, M., Sun, B., Sato, Y. and Todo, S.: Evidence of dual function of macrophage migration inhibitory factor relevant to tumor progression and regression. *Int. J. Mol. Med.* 16(1): 119-126, 2005.
- 8) Kitamura, M., Kitaichi, N., Takeuchi, M., Kitamei, H., Namba, K., Yamagishi, S., Iwabuchi, K., Onoé, K. and Ohno, S.: Decrease in the glyceraldehyde-derived advanced glycation end products (AGEs) in the sera of patients with Vogt-Koyanagi-Harada's disease. *Brit. J. Ophthalmol.* (in press)
- 9) Saito, Y., Yanagawa, Y., Kikuchi, K., Iijima, N., Iwabuchi, K. and Onoé, K.: Low dose lipopolysaccharide modifies reactivity of dendritic cells against various cytokines for IL-12 production. *J. Clin. Exp. Hematopathol.* (in press)
- 10) Yanagawa, Y., and Onoé, K.: Distinct regulation of CD40-mediated interleukin (IL)-6 and IL-12 production via mitogen-activated protein kinase (MAPK) and nuclear factor κ B inducing kinase (NIK) in mature dendritic cells. *Immunology*, (in press)
- 11) Jin, X.H., Ohgami, K., Shiratori, K., Suzuki, Y., Koyama, Y., Yoshida, K., Iieva, I., Tanaka, T., Onoé, K. and Ohno, S.: Effects of blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.) extract on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo. *Exp. Eye Res.* (in press)

- 12) Naito, M., Yamazaki, T., Tsutsumi, R., Higashi, H., Onoé, K., Yamazaki, S., Azuma, T. and Hatakeyama, M.: Influence of EPIYA-repeat polymorphism on the phosphorylation-dependent biological activity of *Helicobacter pylori* CagA. *Gastroenterology*, (in press)
- 13) Kitamei, H., Iwabuchi, K., Yanagawa, Y., Yoshida, K., Namba, K., Kitaichi, N., Kitamura, M., Ohno, S., and Onoé, K.: Amelioration of experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) with an inhibitor of nuclear factor κ B (NF- κ B), pyrrolidine dithiocarbamate. *J. Leukoc. Biol.* (in press)
2. 著書等
- 1) 岩渕和也：動脈硬化とNKT細胞。 *医学の歩み*, 212, 703, 2005.
 - 2) Iwabuchi, K.: "The NKT cell as a new modifier of the development of atherosclerosis" in *The Immunoregulatory Role of Natural Killer T Cells in Inflammatory Disease* (Ed. J.L. Croxford) pp51-69, 2005. Research Signpost (Kerala, India)
 - 3) 小野江和則： *医科免疫学*. 監修, 分担執筆 (印刷中)
 - 4) 小野江和則： *翻訳・Really Essential Medical Immunology 2nd ed.* by Arthur Rabson, Ivan M. Roitt, & Peter J. Delves, 西村書店 (印刷中)
 - 5) 岩渕和也： *翻訳・Really Essential Medical Immunology 2nd ed.* by Arthur Rabson, Ivan M. Roitt, & Peter J. Delves, 西村書店 (印刷中)
 - 6) 柳川芳毅： *翻訳・Really Essential Medical Immunology 2nd ed.* by Arthur Rabson, Ivan M. Roitt, & Peter J. Delves, 西村書店 (印刷中)
 - 7) 小野江和則：免疫寛容。「*肝臓移植の実際*」, 藤堂 省編, 日本医京. (印刷中)
 - 8) 小野江和則：「*宿題報告*」 T細胞免疫系の成立と生体内役割. *日病会誌 (Proc. Jpn. Soc. Pathol.)*, 94, 23-39, 2005.
 - 9) 柳川芳毅, 三浪圭太, 岩渕和也, 小野江和則：Th1/Th2 サイトカイン産生の樹状細胞・NKT細胞を介する negative feedback. *臨床免疫* (印刷中)
3. 学会報告
- 1) 小野江和則： *宿題報告* T細胞免疫系の成立と生体内役割. 第94回日本病理学会. 2005. (於 横浜)
 - 2) 岩渕和也, 上出利光, 小野江和則：マウス実験的網膜ぶどう膜炎 (EAU)におけるオステオポンチン (OPN)の役割. 第94回日本病理学会. 2005. (於 横浜)
 - 3) 高木 大, 中丸裕爾, 前田昌紀, 福田 論, 小野江和則：関節炎モデルにおけるマクロファージ遊走阻止因子およびNKT細胞の役割. 第55回日本アレルギー学会. 2005. (於 盛岡)
 - 4) 柳川芳毅, 三浪圭太, 岩渕和也, 小野江和則：Th1/Th2 サイトカインバランスに対するDC/NKT細胞を介した negative feedback 機構. 第45回日本リンパ網内系学会. 2005. (於 福岡)
 - 5) Onoé, K.: *Symposium (Chairman)*, "Lymphocytes/ NKT cells and bio-defense." International Symposium on Low-Dose Radiation Exposure and Bio-Defense System. 2005. (at Misawa)