

- 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5回再生医療学会. 2006年3月.
6. 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年3月.
7. 長屋昌樹, 窪田倭, 鈴木登, 磯貝晶子, 渡辺泰治, 明石勝也, 三高俊広. ラット肝前駆様細胞の分離・培養と肝細胞への分化の検討. 第5回再生医療学会. 2006年3月.
8. 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年4月.
9. 黒川真奈絵, 奈良和彦, 吉川英志, 松田隆秀, 鈴木登. 神経ベーチェット病脳脊髄液中の炎症性サイトカインの解析. 第50回リウマチ学会. 2006年4月.
10. Ueno H, Kayama M, Homma R, Kurokawa SM, Yoshikawa H, Masuda C, Takada E, Tsubota K, Ueno S, Suzuki N. Experimental Transplantation of Corneal Epithelial Cells Derived From Mouse Embryonic Stem (ES) Cells Transfected With Pax6 Gene. Association for Research in Vision and Ophthalmology. Apr-May, 2006.
11. Kayama M, Ueno H, Homma R, Kurokawa SM, Yoshikawa H, Tsubota K, Ueno S, Suzuki N. In vitro Corneal Epithelial Cell Induction With High Purity by Pax6 Gene Transfection of Mouse Embryonic Stem Cells. Association for Research in Vision and Ophthalmology. Apr-May, 2006.
12. Kondoh Y, Nakamura K, Saito H, Suzuki N, Nagata K. Imaging of improved blood flow response to somatosensory stimulation in cortical injured mice with neural cell transplantation. Imaging and the Aging Brain. May, 2006.
13. 蒲地宏昌, 黒川真奈絵, 穴澤三恵, 吉川英志, 渡辺憲史, 夏木靖典, 木村健二郎, 榊原学, 武田伸一, 別府諸兄, 青木治人, 鈴木登. ES細胞へのIGF II遺伝子導入により分化誘導した筋細胞の移植応用の検討. 第27回日本炎症・再生医学会. 2006年7月.
14. 黒川真奈絵, 奈良和彦, 吉川英志, 金子栄, 森田栄伸, 鈴木登. ベーチェット病におけるtoll様受容体の役割と治療応用. 第27回日本炎症・再生医学会. 2006年7月.
15. 阿藤晃一, 黒川真奈絵, 吉川英志, 熊谷憲夫, 鈴木登. マウス胚性幹細胞からの神経堤細胞の誘導とメラノサイトへの分化. 第27回日本炎症・再生医学会. 2006年7月.
16. 蒲地真里, 吉川英志, 上田裕司, 黒川真奈絵, 渡辺憲史, 榊原学, 明石勝也, 別府諸兄, 青木治人, 鈴木登. Nogo受容体欠損胚性幹細胞由来神経前駆細胞による脊髄損傷モデルの移植治療. 第27回日本炎症・再生医学会. 2006年7月.
17. 上野宏樹, 本間龍介, 嘉山真紀, 黒川真奈絵, 坪田一男, 上野聰樹, 鈴木登. マウス胚性幹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実験. 第27回日本炎症・再生医学会. 2006年7月.
18. 嘉山真紀, 本間龍介, 上野宏樹, 黒川真奈絵, 坪田一男, 上野聰樹, 鈴木登. Pax6遺伝子導入による胚性幹細胞の角膜上皮様細胞への分化誘導とその接着因子の検討. 第27回日本炎症・再生医学会. 2006年7月.
19. 丸山達哉, 奈良和彦, 鈴木登. Th1チロシンキナーゼTxkのIFNg特異的調節機構の解明. 第27回日本炎症・再生医学会. 2006年7月.
20. 黒川真奈絵, 鈴木登. 胚性幹細胞由来血管内皮細胞および壁細胞の分化・増殖・維持に与える喫煙の影響. 財団法人 喫煙科学研究財団 第21回平成17年度助成研究発表会. 2006年7月.
21. 間淑郎, 池田律子, 黒川真奈絵, 吉川英志, 仁藤新治, 中辻憲夫, 橋本卓夫, 鈴木登. カニクイザル胚性幹細胞からの運動神経分化誘導と片麻痺モデルマウスへの移植応用. 第65回日本脳外科学会総会. 2006年10月.
22. 鈴木登, 丸山達哉, 奈良和彦, 黒川真奈絵. Th1特異的に発現するチロシンキナーゼTxkのシグナル伝達機構の解明. 第36回日本免疫学会総会・学術集会. 2006年12月.
23. 奈良和彦, 黒川真奈絵, 金子栄, 吉川英志, 森田栄伸, 松田隆秀, 鈴木登. ベーチェット病の病変部におけるToll様受容体の役割. 第36

回日本免疫学会総会・学術集会. 2006年12月.

24. Kurokawa SM, Suzuki N. Effect of nicotine on the differentiation of vascular endothelial cells from mouse embryonic stem cells. 第36回日本免疫学会総会・学術集会. 2006年12月.

H. 知的財産権の出願, 登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

ペーチェット病の細菌抗原に対する免疫反応に関する研究

分担研究者 小熊 恵二 (岡山大学大学院医歯薬総合研究科病原細菌学教室)
研究協力者 申 蓮花 (岡山大学大学院医歯薬総合研究科病原細菌学教室)
横田 憲治 (岡山大学医学部保健学科)

研究要旨

ペーチェット病患者より分離した *Streptococcus sanguinis* 113-20株は、ヒト好中球を活性化し、末梢血単核球からの IL8産生を強く誘導する事を報告してきた。これまでこの菌の HSP60をクローニングし、そのアミノ酸配列から、HLA-classII分子にのり、T細胞を活性化しやすい配列 (T cell epitope) を含む人工合成ペプチドを作製した。このペプチドのマクロファージに対する作用を検討したところ、ある1つのペプチドは菌の抗原刺激による IL8産生を抑制することを見出した。この現象に関わる遺伝子の発現を cDNA チップで解析したところ、FK506 binding protein が関係している事が予測された。従って、HSP60はマクロファージ活性化作用があるが、そのペプチドは逆の活性がある事が判明した。今後、ペーチェット病で認められる微生物抗原に対する過敏反応との関係と、このペプチドによる免疫寛容の誘導による治療への応用を目指したい。

A. 研究目的

ペーチェット病は、外来微生物に対する免疫反応が、病態形成に関与している事が推察されてきた。我々は、外来抗原の1つとして、ペーチェット病患者口腔内より分離した *Streptococcus* (113-20株) と患者の免疫反応について報告してきた。この菌は、末梢血の好中球を強く活性化し、また単核球からの pro-inflammatory cytokine である IL8や T helper 1 (Th1) を誘導するサイトカインである IL-12の産生を強く誘導した。一方、細菌の熱ショック蛋白 (HSP) が、ペーチェット病の免疫反応に関係しているとの報告があり、この113-20株の HSP60kDa をクローニングし、リコンビナント蛋白を作製した。さらに、この蛋白のアミノ酸配列から、免疫原性の強いと考えられる HLA-classII 分子にのり、T細胞を活性化しやすい配列 (T cell epitope) を含む人工合成ペプチドを作製した。これらの菌の抗原及び HSP 抗原を、マクロファージ培養株である NOMO1と U937細胞に作用させ、免疫系細胞に対する作用を検討した。

B. 研究方法

1) 抗原の作製

Streptococcus 113-20株を Todd-Hewitt 培地で18時間培養後、遠心で集菌した。上清は飽和硫酸で塩析し、PBS で透析した。菌体は、滅菌蒸留水に懸濁し、超音波破碎した。破碎した抗原を 20,000xg, 30分遠心し上清 (細胞可溶化成分) を得た。HSP60は、PCR で増幅した113-20株遺伝子を、GST-Fusion 蛋白として大腸菌で発現させた。ペプチドは113-20株のアミノ酸配列より、HLA-classII 分子にのり、T細胞を活性化しやすい配列 (T cell epitope) を含む人工合成ペプチドを6本作製した。(表1)

2) 培養細胞

マクロファージ系の細胞 NOMO1及び U937を 10% FCS 加 RPMI1640で培養した。抗原刺激した上清、細胞ともに -80℃で測定まで保存した。

3) サイトカインの測定

培養上清中の IL8及び TNF- α の測定は、TECHNE Co のキットで測定した。

4) cDNA チップ

NOMO1細胞を113-20株の細胞破碎抗原とHSP60のペプチド(LO1)で刺激し、mRNAを抽出し、Human Genome U133 Plus 2.0 Array(約47,000の転写産物/約54,000のプロブセットU133A + U133B + 約6,500遺伝子からなる。)で解析した。

(倫理面への配慮)

実験自体は、臨床検体を用いていない。

C. 研究結果

1) 菌体抗原によるIL8の産生

菌体(菌を熱で不活化した抗原)、分泌蛋白、細胞可溶化成分で、NOMO1細胞を刺激し、IL8の産生を見た(図1)。菌体、細胞可溶化成分は、マクロファージからの強いIL8誘導活性を示した。

2) HSP60 ペプチド

113-20細胞可溶化抗原刺激による、IL8産生は、LO1及びUKの添加により抑制された(図2)。しかしTNF産生においては、LO1のみが軽い抑制効果が認められたが、ほとんど影響が無かった(図3)。

3) cDNA チップ

NOMO1細胞に113-20可溶化抗原を作用させた時と、更にHSPペプチド(LO1)を作用させた場合で、mRNAの発現を検討した。113-20による抗原刺激により、免疫反応に関係したケモカイン「chemokine (C-C motif) ligand 20 aquaporin 9, chemokine (C-X-C motif) ligand 2」やサイトカイン(interleukin 1 beta, TNF receptor-associated factor 1, tumor necrosis factor alpha-induced protein 6, interleukin 10, interleukin 12B (natural killer cell stimulatory factor 2, cytotoxic lymphocyte maturation factor 2, p40), interleukin 1 alpha, Interleukin 7 receptor, interleukin 1 beta) 関連遺伝子の発現上昇が認められた。さらにこの系にHSPペプチドLO1を作用させると、「IL-16 (CD4細胞遊走活性), IL-13 receptor alpha1 (IL-13はMHC classII, Mφ遊走活性), IL-17 receptor (IL17

は活性化メモリーCD4細胞より出される炎症性サイトカイン)」等のメッセンジャーの発現が減少していた。またペプチド添加により何らかの細胞表面レセプターを介してサイトカインの抑制がかかると考え、細胞表面レセプター関係のmRNAを検索したところ、CD58とFK506 binding proteinが関係している事が示唆された。

D. 考 察

これまで、ベーチェット病患者の口腔内から分離した*Streptococcus*113-20株が、患者リンパ球や、マクロファージ系細胞からの炎症性サイトカイン産生を誘導する事を報告してきた。昨年この菌のHSPはマクロファージ活性化を起こす蛋白である事を報告した。今回の実験で、その一部であるHSPペプチドには、*Streptococcus*113-20株抗原刺激によるマクロファージからのサイトカイン産生の抑制効果がある事が判明した。このようにHSPは、宿主免疫反応に対して多様な作用がある事が推察され、将来的には、これを利用したベーチェット病患者の免疫寛容の誘導等の治療に応用できる可能性が示唆された。

E. 結 論

*Streptococcus*のHSPは、多彩な免疫活性があり、特にHSPペプチドは、免疫抑制効果があることが、また、この効果は宿主細胞のFK506 binding proteinが関係していることが示唆された。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 申蓮花, 横田憲治, 綾田潔, 阪口義彦, 岡田智行, 趙瑩, 藤本聖人, 小熊恵二. ベーチェッ

ト病における炎症に関与している細菌抗原の解析. 第59回日本細菌学会中四国支部総会 (平成18年10月18~19日, 宇部)

H. 知的財産権の出願, 登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他
特記事項なし

表1 HSP60合成ペプチド

名称	Location	Sequence
LO1	249-264	ADDVDGEAL PTLVLNK
UK	311-326	T IEALGQAAR VTVDKD
IIIa	365-384	ERLAKLSGGVAVIKVGA AATE
IIIb	395-413	EDALN ATRAAVEEGIVAGG
LO2	480-499	GEWVNMIEEGIIDPVK VSR
LO3	504-518	AASVASLILTTEAVV

Location: N-末からの番号

Sequence: 太字はヒトのHSP60と共通なアミノ酸, 下線は T cell epitope

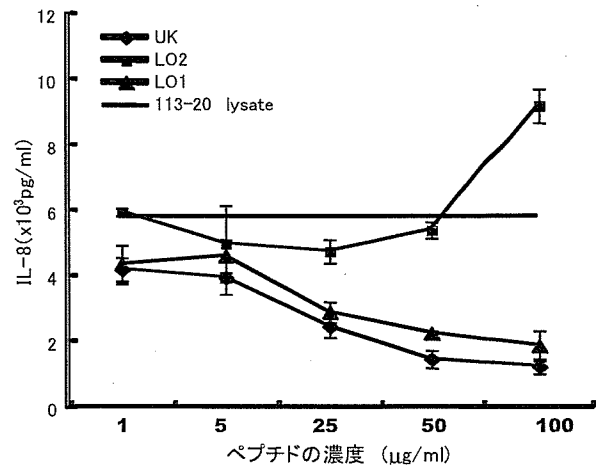
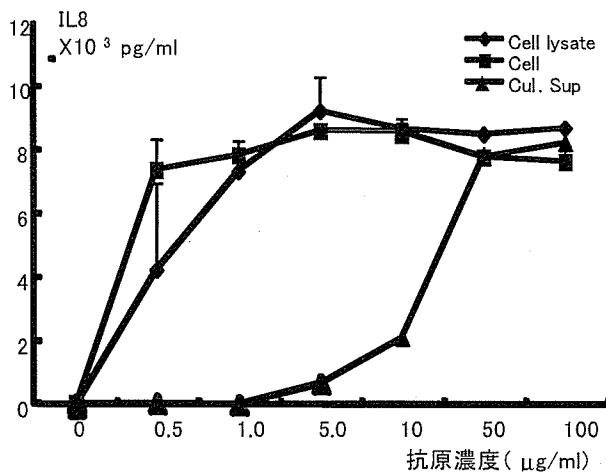


図2 HSP ペプチドによる IL8産生抑制



Cell; 菌体 (菌を熱で不活化した抗原),

Cell lysate; 細胞可溶化成分, Cul. Sup; 分泌蛋白

図1 113-20株抗原刺激による NOMO1からの IL8産生

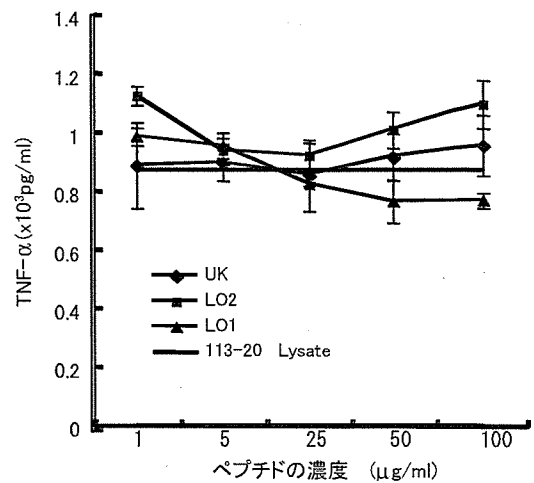


図3 HSP ペプチドによる TNF-α 産生抑制

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 小林 浩子 (福島県立医科大学医学部内科学第二講座)
研究協力者 坂本 夏美 (福島県立医科大学医学部内科学第二講座)
大沼 京子 (福島県立医科大学医学部内科学第二講座)
金子 史男 (南東北病院 皮膚疾患アレルギー研究所)

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 (-1486T/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 および diplotype C-G-A/C-G-A 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. さらにこれらの SNP が TLR9 遺伝子機能に与える影響を検討したところ, -1486 C かつ 1174 G でルシフェラーゼ活性が高い傾向が認められた. 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). 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, その遺伝子変異を検索したところ, 5 つの多型を検出した. そのうち -1486T/C, 1174A/G, 2849 G/A 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る結果を得た (平成17年度報告). そこで今回はこれらの SNP が TLR9 の発現に与える影響を, ルシフェラーゼアッセイを用いて検索した.

B. 研究方法

当施設に通院中の BD 症例で -1486 CC, 1174 GG, 2849 AA の genotype を持つ症例と, -1486 TT, 1174 AA, 2849 GG の genotype を持つ健常人

の genomic DNA の TLR9 部分を特定のプライマーを用いて増幅し, ルシフェラーゼアッセイ用のベクターに組み込んで培養細胞にトランスフェクションし, ルシフェラーゼ活性を測定した. 具体的には以下の手順に従って解析を行った.

- 1) PCR 法にて TLR9 genomic DNA 断片を増幅.
- 2) 制限酵素処理後増幅した DNA 断片をルシフェラーゼアッセイ用のベクターに組み込みクローニング.
- 3) クローニングしたベクターを培養細胞にトランスフェクション.
- 4) 48時間培養後ルシフェラーゼ活性を測定.

(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, Genotype の解析において BD 症例で homozygous -1486 CC, 1174 GG が多く認められ

る事を報告したが、この Genotype を持つベクターは、健常人から抽出した -1486 TT, 1174 AA を持つベクターに比べてルシフェラーゼ活性が約2倍と高い傾向を示した。しかし、統計学的には有意差は認められなかった。

D. 考 案

今回検討した2つの SNP のうち、-1486 T/C はプロモータ領域に存在し、また、1174 A/G はイントロン領域に存在することから、これらの SNP の存在がプロモータ活性の上昇やスプライシングの異常などの原因となることで TLR9 の発現に影響を与える可能性が考えられた。

E. 結 論

これまでの TLR9 の SNP の検討で、BD 症例において -1486 CC, 1174 GG, 2849 AA 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が認められている。また、SNP の存在が遺伝子発現にも影響する可能性が考えられることから、これらの TLR9 の SNP が BD の病因・病態に直接関与している可能性もありうると考えられた。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

ベーチェット病における HO-1発現低下と TLR 発現異常

分担研究者 石ヶ坪良明 (横浜市立大学病態免疫制御内科)
共同研究者 渡邊 玲光 (横浜市立大学病態免疫制御内科)
岳野 光洋 (横浜市立大学病態免疫制御内科)
桐野 洋平 (横浜市立大学病態免疫制御内科)
村上 修司 (横浜市立大学病態免疫制御内科)
小林 正芳 (横浜市立大学病態免疫制御内科)
水木 信久 (横浜市立大学眼科)

研究要旨

ベーチェット病 (BD) における toll-like receptor (TLR) と抗炎症蛋白 heme oxygenase (HO)-1の発現との関連, 病態への関与を検討するため, 末梢血単核細胞 (PBMC), 多核白血球 (PMN) より mRNA を抽出し, real-time PCR 法で TLR-2,4,9 および HO-1 mRNA を半定量的に解析した. PBMC を TLR4リガンドの LPS で刺激し, HO-1蛋白の発現を Western 法で解析した. 単球に HO-1発現ベクター, siRNA を導入し, サイトカイン産生および TLR の発現を解析した.

HO-1mRNA 発現は BD の PMN では活動性を問わず, PBMC ではその疾患活動期に健常者に比較し低下していた. 一方, TLR4 mRNA 発現は疾患活動性を問わず BD の PBMC, PMN で亢進していた. PBMC の HO-1発現は LPS 刺激により TLR4発現量に応じて低下した. HO-1発現量と炎症性サイトカイン産生は逆相関を示した. 以上の結果より, BD 白血球では HO-1発現低下が炎症惹起に作用し, その要因の一つに TLR4発現亢進が関与している可能性がある.

A. 研究目的

ベーチェット病では自己免疫疾患としての側面に加え, 自然免疫系の活性化が病態に関与している. これまで, 病原微生物からヒトまで抗原性が高く保存されている熱ショック蛋白 (heat shock protein 65; HSP65) の交差反応を介した自己免疫機序が注目されてきた. さらに近年, この HSP を含め, 病原微生物の構成成分が toll-like receptor (TLR) を介して自然免疫系を活性化することが解明され, ベーチェット病においてもその関与が検討されている. しかしながら, まだ仮説の段階であり, 十分明らかでない.

一方, 私どもはベーチェット病をはじめとした炎症性疾患において, 抗炎症作用を有する heme oxygenase-1 (HO-1) について研究を進めているが, 本研究では, 自然免疫系の活性化にかかわる TLR と炎症制御にかかわる HO-1について, ベー

チェット病患者白血球を用いて検討した.

B. 研究方法

1. 対象: 厚生労働省ベーチェット病診断基準 (1987年) を満たす患者30例 (男19例, 女11例, 平均年齢 48.7 ± 15.0 才). 活動期10例, 非活動期20例. 眼病変14例, 神経型3例, 腸管型2例, 血管型2例. 治療はコルヒチン, サイクロスポリン, プレドニゾロン他を服用していた. 健常者30名をコントロールとした.

(倫理面への配慮)

すべての血液供給者に対し, 研究の目的, 使用方法を説明し, 文書にて同意を得た上で採血を行った.

2. 白血球の mRNA 発現解析: 末梢血より二重フィコール分離法を用いて末梢血単核細胞 (PBMC), 多核白血球 (PMN) を分離し, AGPC

法によりRNAを抽出した。HO-1, TLR2, TLR4, TLR9のmRNAはTaqManのreal time PCR法にて解析した。各mRNAの発現量は、内因性コントロールのGAPDHで補正し、arbitrary unitで定量化した。

3. HO-1 蛋白発現解析：分離直後あるいはLPS刺激後のPBMCより蛋白を抽出し、抗HO-1抗体を用いた免疫ブロッティング法により半定量的に解析した。

C. 研究結果

1. ベーチェット病患者白血球におけるHO-1 mRNAの発現

ベーチェット病患者のHO-1 mRNAの発現は、PBMCにおいては疾患活動期に、PMNにおいては疾患の活動性に関係なく健常者に比較して有意に低下していた。このHO-1の低下と病型、治療薬に関連は見出せなかった。

2. ベーチェット病患者白血球におけるTLR mRNAの発現

TLR2についてはPBMC, PMNともに患者、健常者間で差異を認めなかった。TLR4では患者PBMCで活動性の有無に関わらず亢進し、PMNでも同様の傾向を認めた。一方、TLR9はPBMC, PMNのいずれにおいても健常人に比較して患者の方が低発現であった。

3. HO-1とTLR4のmRNA量発現の関連

次にHO-1の発現とTLR発現の関連を検討したところ、PBMCにおいて、TLR4とHO-1のmRNA発現量は負の相関にあった。HO-1と他のTLRの発現量には相関はなかった。

4. TLRとHO-1の相互への影響

以上の成績より、ベーチェット病患者白血球におけるTLR4の過剰発現が、HO-1の発現低下に関与している可能性が考えられる。そこで、PBMCをTLR4のリガンドであるLPSで刺激し、HO-1蛋白の発現量を検討したところ、その減少が確認された。さらに、患者PBMCにおいてTLR4の発現量はLPS刺激によるHO-1の発現変化量の間には負の相関がみられた。

次に、逆にHO-1発現ベクターをヒト単球にトランスフェクトし、HO-1を過剰発現させ、

TLR2, TLR4, TLR9の発現に対する影響を検討したところ、いずれもコントロールと差異を認めなかった。

5. HO-1発現調節と炎症性サイトカインの産生

単球にHO-1発現ベクターをトランスフェクトし、IL-6, IL-8, TNF- α の産生量を解析すると、いずれの炎症性サイトカインの産生も低下した。逆に、HO-1 siRNAベクターをトランスフェクトし、HO-1蛋白発現をノックダウンすると、炎症性サイトカイン産生は亢進した。

D. 考 察

HO-1の抗炎症作用については多数の報告がある。HO-1遺伝子治療や誘導療法は種々の炎症性疾患に治療的に作用する一方、HO-1欠損児やHO-1ノックアウトマウスでは激しい炎症が観察されている。本研究でもHO-1発現ベクターおよびHO-1 siRNAベクターを用いた実験から、HO-1の発現量と炎症性サイトカインの産生量には負の相関があることが判明し、HO-1の抗炎症作用の一端が検証された。

本研究では、ベーチェット病患者では特に活動期に白血球におけるHO-1の発現低下が認められ、HO-1による炎症制御の不全がベーチェット病の病態形成に関与している可能性が示唆された。さらに、TLRの解析結果では、ベーチェット病患者白血球にTLR4発現亢進を認め、TLR4リガンドであるLPS刺激により、TLR4の発現量に依存してHO-1発現は低下した。以上の成績より、ベーチェット病では恒常的にTLR4の発現亢進があり、その発現亢進が疾患活動期にHO-1発現低下に関与し、炎症制御不全を来たすものと考えられた。したがって、HO-1発現低下を是正する手段はベーチェット病における治療手段に応用できる可能性がある。

E. 結 論

ベーチェット病患者の白血球においてTLR4発現の亢進が認められ、HO-1の発現と逆相関する。したがって、本疾患の炎症病態の促進に、TLR4亢進によるHO-1の低下が関与し、HO-1が治療標

的となる可能性がある。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kobayashi H, Takeno M, Saito T, Takeda Y, Kirino Y, Noyori K, Hayashi T, Ueda A, Ishigatsubo Y. Regulatory role of heme oxygenase 1 in inflammation of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 54: 1132 – 1142, 2006
2. Sato T, Takeno M, Honma K, Yamauchi H, Saito Y, Sasaki T, Morikubo H, Nagashima Y, Takagi S, Yamanaka K, Kaneko T, Ishigatsubo Y. Heme Oxygenase-1, a Potential Biomarker of Chronic Silicosis, Attenuates Silica-induced Lung Injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 174 (8): 906 – 14, 2006
3. Takeno M, Ishigatsubo Y.: Behcet's disease and familial Mediterranean fever. *Intern Med.* 45 (13): 805 – 6, 2006.
4. Kirino Y, Takeno M, Murakami S, Kobayashi M, Kobayashi H, Miura K, Ideguchi H, Ohno S, Ueda A, Ishigatsubo Y, Tumor necrosis factor-alpha acceleration of inflammatory responses by down regulating heme oxygenase-1 in human peripheral monocytes. *Arthritis Rheum* in press
5. 桐野洋平, 岳野光洋, 石ヶ坪良明: 血球貪食症候群および成人 Still 病における血清 heme oxygenase-1 (HO-1) の高発現の意義. *臨床免疫* 45 (1): 75 – 78, 2006
6. 石ヶ坪良明: Heme oxygenase-1 (HO-1) と炎症性疾患. *リウマチ科* 35 (1): 52 – 7, 2006

2. 学会発表

1. Takeno M, Kirino Y, Murakami S, Watanabe R, Kobayashi M, Hasumi Y, Mizuki N, Ishigatsubo Y. Reduced HO-1 expression are involved in inflammation of Behcet disease. XII I International

Behcet Disease Conference, Lisbon, Portugal, 2006, Sep

2. Kirino Y, Takeno M, Murakami S, Kobayashi M, Kobayashi H, Miura K, Ohno S, Ueda A, Ishigatsubo Y. Tumor Necrosis Factor-Alpha Accelerates Inflammatory Responses through Down Regulation of Heme Oxygenase-1 in Human Peripheral Monocytes. 70th ACR, Washington DC, 2006, Nov
3. Takeno M, Kirino Y, Murakami S, Watanabe R, Kobayashi M, Hasumi Y, Mizuki N, Ishigatsubo Y. Increased Expression of TLR 4 Associated with Reduced HO-1 Accelerates Inflammatory Responses in Behcet disease Washington DC, 2006, Nov
4. 岳野光洋, 桐野洋平, 渡邊玲光, 村上修司, 小林正芳, 関口章子, 小林弘, 井畑敦, 泉二恭輔, 上田敦久, 水木信久, 石ヶ坪良明. ベーチェット病患者白血球における toll-like receptor の発現. 第50回日本リウマチ学会総会・学術集会, 長崎, 2006年4月
5. 小林秀郎 岳野光洋 野寄浩司 武田由希子 桐野洋平 林 毅 荒武正人 石井克志 佐藤雅経 齋藤知行 石ヶ坪良明. 関節リウマチ滑膜細胞株における Heme Oxygenase-1 と carbon monoxide の抗炎症効果とその作用機序. 第50回日本リウマチ学会総会・学術集会, 長崎, 2006年4月
6. 桐野洋平, 岳野光洋, 小林秀郎, 上田敦久, 石ヶ坪良明. 炎症性・抗炎症性サイトカインに対する heme oxygenase-1 の反応性. 第50回日本リウマチ学会総会・学術集会, 長崎, 2006年4月
7. Yohei Kirino, Mitsuhiro Takeno, Shuji Murakami, Masayoshi Kobayashi, Yoshiaki Ishigatsubo Tumor Necrosis Factor-Alpha Accelerates Inflammatory Responses by Down Regulating Heme Oxygenase-1 in Human Peripheral Monocytes. 第36回日本免疫学会学術集会総会, 大阪, 2006年12月

H. 知的財産権の出願, 登録状況

特になし

表1 ベーチェット病患者白血球における HO-1, TLR mRNA 発現

	Behcet's disease (n = 30)			Healthy Control (n = 30)
	All	Active (n = 10)	Inactive (n = 20)	
Mean age (SD)	48.7±15.0	46.4±14.6	49.4±15.8	
Gender M / F	11 / 19	5 / 5	6 / 13	
PBMC				
HO-1	6.9±3.7	5.6±4.5*	7.4±3.2	10.0±8.0
TLR2	47.0±22.2	38.0±19.0	51.1±23.7	50.5±20.1
TLR4	91.5±29.0*	91.9±24.8*	90.0±32.0*	72.5±39.7
TLR9	52.8±4.9*	45.3±27.1*	56.6±26.0*	75.3±9.4
PMN				
HO-1	34.3±41.5*	31.3±44.5	27.7±20.0*	43.9±33.3
TLR2	98.4±53.6	110.4±71.4	92.4±43.0	95.1±35.1
TLR4	270.2±209.1	290.8±245.8	260.0±193.9	194.0±106.3
TLR9	65.8±27.4*	57.2±26.6*	70.1±27.4*	89.6±20.9

* P < 0.05 by
Mann-Whitney U test

抗菌ペプチドの問題点とその克服および 抗菌ステロイドへのシフトについて

分担研究者 磯貝恵美子 (北海道医療大学歯学部口腔衛生学教室)
研究協力者 奥村 一彦 (北海道医療大学歯学部口腔外科学教室)
磯貝 浩 (札幌医科大学医学部実験動物施設)
南場 研一 (北海道大学大学院医学研究科視覚器病学分野)
大野 重昭 (北海道大学大学院医学研究科視覚器病学分野)
大神 一浩 (北海道大学大学院医学研究科視覚器病学分野)
小熊 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)
P. B. Savage (Univ. of Education, Brigham Young University)

研究要旨

異物処理の最初の防御壁となる自然免疫機構にはペプチド、脂質などを含めた多くの抗菌物質が存在している。我々はカセリシジンファミリーの好中球由来抗菌タンパク (CAP18) の活性ドメインが内毒素の中和活性を有し、種々の炎症性サイトカインの産生を抑制することを証明した。この活性ドメインは粘膜上皮から分泌される LL37 と同様のアミノ酸シークエンスを示し、腸内細菌由来のリポ多糖だけでなく、リポド A の構造が異なる細菌由来のリポ多糖やグラム陽性細菌のリポタイコ酸にも結合した。CAP18/LL37 合成ペプチドは有用な活性を持つが、合成に多額の費用がかかることと安定性の上での問題がのこった。これを乗り越えるための戦略として、アミノ酸置換体によって強力なペプチドを合成した。また、乳酸菌による刺激によっての産生誘導の可能性を示してきた。さらに、本研究では細胞に遺伝子導入を試み、自然免疫の能力を賦与することが可能であることを示した。一方、CSA-13 はカチオン性合成ステロイドとして新規に開発された。このカチオン性ステロイド抗菌剤は合成が容易であり、口腔病原細菌に対して CAP18/LL37 と同様の活性を持つことが明らかとなった。

A. 研究目的

ペ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。

Ceragenin (CSA-13) はカチオン性合成ステロイドである。新規に開発されたこのステロイド抗菌剤は合成が容易であり大量生産が可能であるとともに、生体内において塩や蛋白分解酵素などの影響を受けにくく強い抗菌活性を有することが示唆されてきた。口腔内には多種多様の細菌が生息している。我々はこれまで生体内で作られる CAP18/LL37 の活性ドメイン領域の合成ペプチドが *Porphyromonas* 属細菌をはじめとし、種々の口腔細菌に効果を示すことを明らかにしてきた。

CSA-13 はこれまで MRSA や緑膿菌などについて検討されているが、口腔細菌への作用は不明であった。そこで、我々は口腔細菌に対する CSA-13 の抗菌活性を調べた。

B. 研究方法

CAP18/LL37 の活性ドメイン領域をコードしている CAMP 遺伝子の細胞への導入を行った。導入細胞選択のためにビタミン D3 (強力な CAMP 遺伝子の inducer) で刺激後、定量 RT-PCR で発現のみられない非分泌型の細胞を選択した。ついで、この細胞 SAS-H1 に遺伝子を導入した。PCR 陽性のクローンについて培養上清の抗菌活性を調べた。

CSA-13合成ステロイドは Savage 研究所 (Univ. of Education, Brigham Young University) から得た。CSA-13と CAP18/LL37の活性ドメイン領域の構造を図1に示した。CAP18/LL37の活性ドメイン領域のペプチドを比較として用いた。

歯周病病原菌として12株の *P. gingivalis*, う蝕病原菌として23株の *Streptococcus mutans*, ペーチェット病患者由来菌として30株の患者口腔由来 *S. sanguinis* および *S. oralis*, を使用した。抗菌活性は CSA-13を培地中に添加して菌を培養し, 生存菌数を計測することで求めた (寒天平板法)。さらに, ハンクスバッファーで希釈した CSA-13あるいは CAP18/LL37の活性ドメイン領域のペプチドの殺菌活性を調べた (感受性試験)。

LPS あるいは LTA への結合活性はヒトO型赤血球に種々の細菌から得られた LPS あるいは LTA をコートし, 赤血球凝集試験を行った。

C. 研究結果

ビタミン D3で刺激後, HaCaT や U937は RT-PCR で陽性であり, 時間依存性の反応を示した (図2)。一方, SAS-H1は陰性だった。そこで, SAS-H1に CAMP 遺伝子を導入した。CAMP 遺伝子を導入した SAS-H1から4つのクローンを選択した。このうち, S-3はもっとも強い発現を示した。さらに, その培養上清をもちいて感受性試験を行ったところ, 遺伝子導入以前では見られなかった殺菌活性が見られるようになった。

CSA-13はペーチェット病由来口腔の連鎖球菌, 歯周病原性細菌, う蝕病原性細菌の全てに対して抗菌活性を示した。また, その作用は CAP18/LL37活性ドメインと同様か上回るものであった。図3にペーチェット病由来ストレプトコッカスを用いての感受性試験の結果を示した。

CSA-13は CAP18/LL37活性ドメインや BMAP-28 (牛のカセリシジンファミリー抗菌ペプチド) と同様に LPS や LTA への結合活性を示した (図4)。

D. 考 察

抗菌ステロイドは強い抗菌活性を示した。抗菌ペプチドで指摘されている免疫機構への作用も示

唆されており, 抗菌活性と免疫機構に対する作用を併せ持つことでペーチェット病の炎症制御も行えると考えられる。

CAP18/LL37活性ドメイン領域の合成ペプチドは人に備わった自然免疫の力を補充するという考えのもとに, これまでの治療薬による副作用や耐性菌や耐性細胞の出現を抑制するための新しい治療戦略をめざしたものである。しかし, 期待以上の効果が見いだされたにもかかわらず, 実際の治療に用いるとすれば高額医療費を患者が負担せざるをえない。CAP18/LL37を1mg合成するには約10,000円, CSA-13を1,000mg合成するには200~300円のコストがかかる。CSA-13は CAP18/LL37の1,000倍合成しても, 値段を1/3以下に抑えることができる。医療費負担の軽減にも貢献するといえる。

E. 結 論

CAP18/LL37非産生細胞に CAMP 遺伝子を導入することで, 自然免疫の能力を賦与することが可能であることを示した。一方, 新規に開発された CSA-13はカチオン性合成ステロイド抗菌剤として口腔病原細菌に対し CAP18/LL37と同様の活性を持つことが明らかとなった。価格および安定性から CSA-13へのシフトは選択枝のひとつとなるであろう。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

《著 書》

1. 磯貝恵美子, 磯貝 浩: 茶抽出エキスの歯周病予防効果. P.115-127, ペットフードの開発 (本好茂一監修), シーエムシー出版, 2006
2. 磯貝恵美子, 犬のライム病, 動物の感染症 (第2班, ハイブリッドCD付), 243, 2006

《総 説》

1. 磯貝 浩, 磯貝恵美子, 奥村一彦, 広瀬公治:

乳酸菌の菌体成分および誘導物質による生き残り戦略, Jpn. J. Lactic Acid Bacteria, Vol.17 (1), 40-46

《原著》

1. Kawahara M, Rikihisa Y, Lin Q, Isogai E, Tahara K, Itagaki A, Hiramitsu Y, Tajima T. Novel Genetic Variants of *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma centrale*, and a Novel *Ehrlichia* sp. in Wild Deer and Ticks on Two Major Islands in Japan Appl Environ. Microbiol. Feb; 72 (2): 1102 - 1109, 2006
 2. 小林奈津実, 西川武志, 岡安多香子, 山田玲子, 磯貝恵美子, 磯貝 浩, 山下利春 カテキン含有飲料のサルモネラに対する殺菌および増殖抑制効果の検討, 四国医学雑誌 62 (1, 2), 43-48, 2006
 3. Kobayashi-Sakamoto M, Hirose K, Nishikawa M, Isogai E, Chiba I. Osteoprotegerin protects endothelial cells against apoptotic cell death induced by *Porphyromonas gingivalis* cysteine proteases. FEMS Microbial Lett, 264 (2): 238 - 245, 2006
2. 国際学会発表
1. Kobayashi-Sakamoto M, Hirose K, Isogai E, Nishikawa M, Chiba I. Role of osteoprotegerin in endothelial apoptosis by *Porphyromonas gingivalis* protease. AADR, March 8 - 11, 2006, Orland, USA.
 2. Okumura K, Muraoka K, Tanimura A, Isogai E, Hosokawa Y, Itoh A, Shibata T, Isogai H. The hCAP18 induces Ca^{2+} release from endoplasmic reticulum. IADR June 28-July 1, 2006, Brisbane, Australia
 3. Isogai E, Isogai H, Kaneko F, Ohno S. New biomarker evidence of oxidative stress in serum and whole saliva. 12th I CBD, September 20 - 23, Lisbon, Portugal
 4. Isogai H, Isogai E, Ohno S, Takahashi K, Okumura K, Savage PB. Antimicrobial activities of a ceragenin, CSA-13, against oral streptococci isolated from patients with Behcet's disease. 12th I CBD, September 20 - 23, Lisbon, Portugal
 5. Isogai E, Isogai H, Okumura K, Nishikawa T, Savage PB. A cationic steroid antibiotics (CSA-13) exhibits antimicrobial activity against cariogenic and periodontopathic bacteria. ICAAC September 27 - 30, 2006, SF, USA

H. 知的財産権の出願, 登録状況

「インターフェロン α を含む口腔組成物」

吉岡邦明, 佐藤 耕, 五反田 亮, 伊藤 亮, 磯貝恵美子, 竹原一明, 前原信敏, 清水初志, 新見浩一

提出日: 2006年1月12日

出願番号: 特願2006-4526

CAP18/LL37 (cationic peptide antibiotics) と CSA-13 (cationic steroid antibiotics) の構造

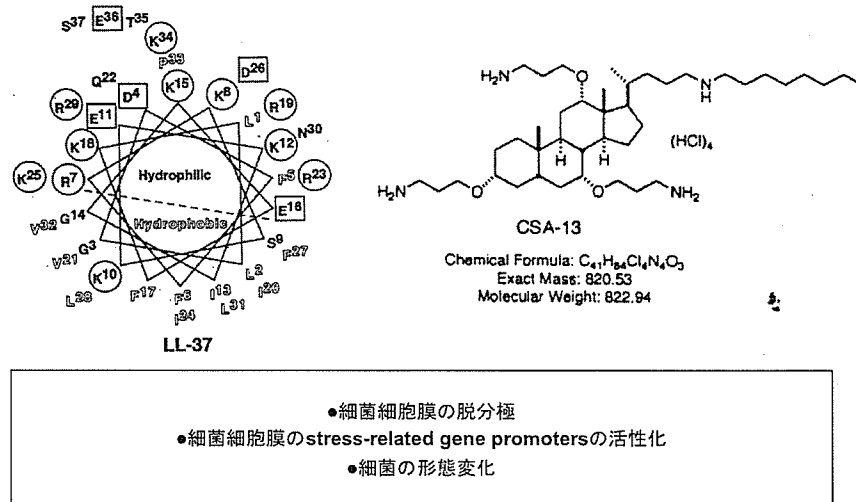


図1 CAP18/LL37とCSA-13の構造

CAMP 遺伝子の導入

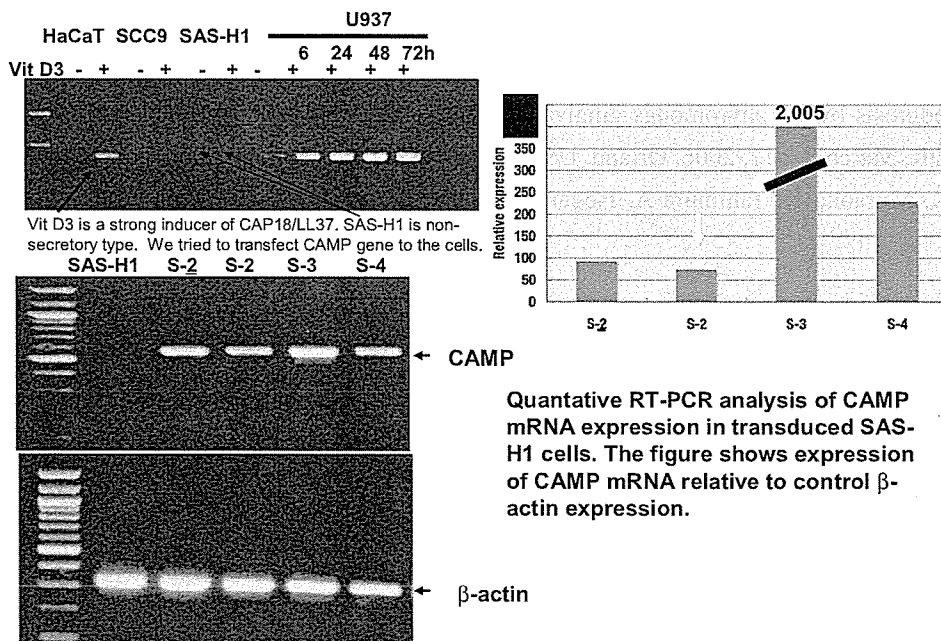
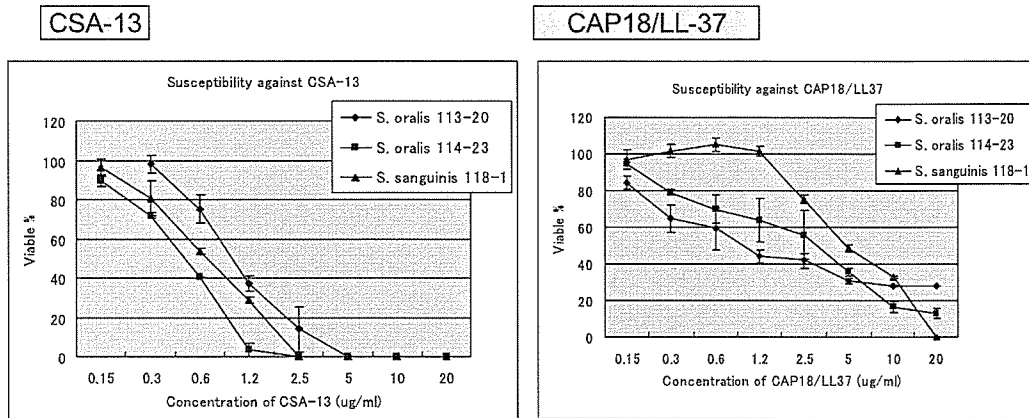


図2 CAMP 遺伝子導入のための細胞株選択と SAS-H1への遺伝子導入

感受性試験 (BD 由来ストレプトコッカス)



CSA-13 はCAP18/LL37活性ドメインと同様にBD由来株に対して抗菌活性を示す。その活性は抗菌ペプチドに比べて強い。

図3 ベーチェット病由来ストレプトコッカスに対する感受性試験

表1 CSA-13および cathelicidine ファミリーに属する抗菌ペプチドのLPSおよびLTAへの結合活性

LPS/CW/LAT from	Hemagglutination/Hemolysis (μg/ml)		
	CSA-13	Human CAP18 ₁₀₉₋₁₃₅	Bovine BMAP28
LPS from <i>P. gingivalis</i> 381	10.0	5.0	2.5
LPS from <i>P. gingivalis</i> ATCC33277	10.0	2.5	5.0
LPS from <i>P. circumdentria</i> NCTC12469	10.0	2.5	5.0
LPS from <i>S. minnesota</i> R595	10.0	1.2	5.0
LPS from <i>E. coli</i> O111:B4	5.0	5.0	2.5
LPS <i>S. flexneri</i> serotype 1A	20.0	20.0	5.0
CW from <i>Streptococcus oralis</i> 113-20	10.0	5.0	5.0
LTA from <i>Streptococcus oralis</i> 113-20	10.0	5.0	5.0

実験動物モデルと眼病変

CXCR3, CCR5ダブルノックアウトマウスによる 実験的ぶどう膜炎とその検討

分担研究者 川島 秀俊 (さいたま赤十字病院眼科)
研究協力者 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】 Th1リンパ球に選択的に発現する CXCR3と CCR5の同時欠損がマウス実験的ぶどう膜炎 (以下 EAU) にどう影響するかを明らかにする

【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 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欠損しても, 何らかの強い代償機構が, EAU の発症をむしろ重症化させている可能性が考えられた.

A. 研究目的

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 マウスのリンパ節より採取して培養し, 他のマウスに移植することでEAUを引き起こす, いわゆる uveitogenic な T細胞が, Th1細胞に特徴的なサイトカイン産生を示したとする報告や¹⁾, EAU を起こしやすい種のラットが, ぶどう膜特異抗原に対して Th1優位な反応を起こしたとする報告²⁾がある. 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.

昨年我々は, CXCR3ノックアウトマウスが正常 C57BL/6マウスに比べて強いEAUを起こすことを示した. そこで今回は, マウスを使った

EAUにおけるCXCR3やCCR5の役割をさらに追求することを目的に, 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.

B. 研究方法

対象は C57BL6マウス, 8週齢, 雌. wild type (WT) と DKO. 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.

検眼鏡的なぶどう膜炎評価のために, Thruら

の論文³⁾にある clinical score を用いた。ただし、Grade4の眼底所見に加えて虹彩後癒着を起こしたものを特別に Grade5とした。この詳細については、表1に示す。

病理組織学的なぶどう膜炎評価についても、Thrauらの論文³⁾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、DKO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、DKO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 2.5×10^5 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 $30 \mu\text{g/ml}$ の濃度で添加された well、 $100 \mu\text{g/ml}$ の濃度で添加された well を作り、48時間培養した。その後³H-Thymidineを加えて18時間後にリンパ球に取り込まれた³H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。リンパ球増殖試験と同様の方法で72時間培養後、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、TNF- α 、IFN- γ であり、測定にはBiosource社のELISA kitを使用した。

(倫理面への配慮)

実験に使用した動物の取り扱いについては、Association for Research in Vision and Ophthalmologyの実験動物取り扱い規定に従った。

C. 研究結果

WTマウスとDKOのEAU clinical scoreの経過を免疫後14日目と22日目で比較したところ、どちらのtime pointにおいてもDKOがWTより強く疾患が出ていることが確認された。いずれのマウスにおいても、14日目より22日目の方でclinical scoreが高くなっていた。

免疫後22日目におけるclinical scoreをWTとDKOで比較した(図1)。WTのclinical scoreは平均 0.85 ± 0.97 であったのに対し、DKOでは平均 2.94 ± 1.56 であり、DKOで有意に高い結果であっ

た ($p < 0.01$, Mann-Whitney's U-test)。

次に22日目の眼球摘出標本 (HE染色) より、histopathological scoreを比較した(図2)。WTのhistopathological scoreは平均 0.88 ± 1.23 であったのに対し、DKOでは平均 2.65 ± 1.80 であり、これもDKO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3に示す。脾臓では、IRBP-peptide $30 \mu\text{g}$ の刺激下においてDKOでWTより増殖傾向が強い傾向 ($p = 0.082$) が認められた。頸部リンパ節では、IRBP-peptide $100 \mu\text{g}$ の刺激下においてDKOでWTより増殖傾向が強い傾向 ($p = 0.070$) が認められた。

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4、5に示す。Th2細胞と関連するIL-4は、脾細胞と頸部リンパ節細胞いずれにおいても非常に低値であり、WTとDKOの間に有意差を認めなかった。一方、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DKOで有意に産生が高かった ($p < 0.05$)。pro-inflammatory サイトカインであるTNF- α も、脾細胞においてDKOで有意に産生が高かった ($p < 0.01$)。また、Th1系サイトカインであるIFN- γ も、脾細胞においてDKOで有意に産生が高かった ($p < 0.01$)。

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。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(図6) ($p < 0.05$, Student t-test)。

D. 考 察

CXCR3KOでWTより疾患が悪化している理由として、かつてはCCR5が欠損したCXCR3の機能を代償している可能性が否定できなかったのだが、CXCR3KOのみならずDKOでも炎症がより高度となった以上、その可能性は否定されたといえる。それでは何故これらのノックアウトマウスでEAUがより高度となるのか、こ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、

脾臓と頸部リンパ節細胞におけるリンパ球増殖試験において、DKO マウスでWTより高い増殖（傾向差）を示したことより、DKOで脾臓やリンパ節におけるIRBP特異的リンパ球が炎症局所やその付随リンパ節へ遊走できないために脾臓・リンパ節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, TNF- α , IFN- γ 産生が、DKO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⁴⁾でも、同様の傾向が報告されている。これら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。

E. 結 論

DKOでも、実際はWTに比して重症化が認められた。脾細胞や頸部リンパ節細胞のリンパ球増殖試験では、DKOマウスで増殖が強い傾向であった。サイトカイン産生試験では、脾細胞のIL-6, TNF- α , IFN- γ が、DKOマウスでより高値の傾向にあった。

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) Xu H, Rizzo LV, Silver PB et al. Uveitogenicity is associated with a Th1 like lymphocyte profile: cytokine-dependent modulation of early and committed effector T cells in experimental autoimmune uveitis. *Cell Immunology* 1997; 178: 69-78.
- 2) Caspi RR, Sun B, Agarwal RK et al. T cell mechanisms in experimental autoimmune uveoretinitis: susceptibility is a function of the cytokine response profile. *Eye*. 1997; 11: 209-212.
- 3) 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.
- 4) 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

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kazuhide Akiyama, Jiro Numaga, Atsushi Yoshida, Hidetoshi Kawashima, Toshikatsu Kaburaki and Yujiro Fujino. :Statistical Analysis of Endogenous Uveitis at Tokyo University Hospital (1998-2000). *Jpn J Ophthalmol*. 50: 69-71, 2006
2. Mingcong Wang, Atsushi Yoshida, Hidetoshi Kawashima, Hiroshi Takahashi, and Junko Hori: Immunogenicity and antigenicity of allogeneic amniotic epithelial transplants grafted to the cornea, conjunctiva, and anterior chamber. 47: 1522-32, 2006
3. Russel W. Reed. Et al: Evaluation Of The Effect On Outcomes Of The Route Of Administration Of Corticosteroids In Acute Vogt-Koyanagi-Harada Disease" *Am J Ophthalmol*. 142: 119-124, 2006
4. 藤村茂人, 蕪城俊克, 沼賀二郎, 藤野雄次郎, 川島秀俊 (東京大). CXCR5& CCR5ノックアウトマウスにおけるEAU. 平成17年度厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班班. 平成17年度研究業績. pp36-41, 2006
5. 高本光子, 川島秀俊, 蕪城俊克, 吉田 淳, 沼賀二郎, 藤野雄次郎: レミケードを3年以上にわたり投与を継続したベーチェット病の一症例. 平成17年度厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班班. 平成17年度研究業績. pp58-62, 2006
6. 川島秀俊: 皮膚・感覚器系の解剖・生理と疾病～眼. 眼科関連MR研修テキスト I (2006年版). Pp257-259, 2006
7. 川島秀俊: 皮膚・感覚器系の検査と治療～眼科領域. 眼科関連MR研修テキスト I (2006年版). Pp264-266, 2006