

好中球および粘膜上皮由来の抗菌ペプチド CAP18/LL-37活性ドメイン およびカチオン性合成抗菌ステロイドによる新しい治療法へのアプローチ

分担研究者 磯貝恵美子（北海道医療大学歯学部保健衛生学教室）
研究協力者 磯貝 浩（札幌医科大学医学部実験動物施設）
奥村 一彦（北海道医療大学歯学部口腔外科学教室）
小林美智代（北海道医療大学歯学部保健衛生学教室）
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ケンスを示し、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。その活性ドメインは細菌に対する作用だけでなく、宿主免疫機構の調節機構も担っていた。

CAP18/LL37合成ペプチドは有用な生物活性を持つが、合成に多額の費用がかかり、宿主あるいは細菌由来のプロテアーゼによって活性を失う可能性がある。こうした安定性の上での問題を乗り切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、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。

工業レベルで大量生産ができる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だけでなく、生体への作用も同様であった。これらの治療薬の開発はパーチェット病（BD）における炎症の制御に有用であろう。

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。抗菌ペプチドや抗菌ステロイドは外因となる口腔細菌の制御を可能とするかもしれない。それだけでなく、生体の免疫機構に及ぼす様々な生物活性を有することが推測できた。

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。抗菌作用としてはBD由来の口腔ストレプトコッカスに対しても強い抗菌活性を示した。また、その時の結合サイトはリポタイコ酸（LTA）であった。本研究での第1の目的はこの合成ペプチドの生体への作用を明らかにすることである。

第2の目的は、カチオン性合成ステロイドとし

て新規に開発された CSA-13 の生物活性を抗菌ペプチドと比較することである。このカチオン性ステロイド抗菌剤は Savage 博士が開発したもので、合成が容易であり、生体内での酵素による分解に抵抗性であると考えられている。

CAP18/LL37 はもともと生体内の物質であり、その制御は炎症の制御や感染抵抗性に関与するといえる。CSA-13 はコストと安定性についての問題をクリアできる可能性を秘めている。ともに、新規の治療薬の候補として検討したい。

B. 研究方法

合成ペプチドとしては CAP18 活性ドメイン (FRK SKEKIGKEFK RIVQRIKDFL RNLV) を用いた。ペプチドの合成はペプチド研究所に依頼した。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 (図 2)。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。好中球の活性測定は全血化学発光法を用いた。単独での活性誘導およびチモゼン添加後の活性増強の 2 点について調べた。

血管内皮細胞としては、ヒト皮膚由来血管内皮細胞を用い、抗菌ペプチドあるいは抗菌ステロイドがチューブ形成に及ぼす作用について調べた。

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 はベ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 にベ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。構造の異なる歯周病原細菌由来 LPS やベーチェット病患者から分離された口腔ストレプトコッカス由来 LTA に対しても R595 などの LPS に対しても同様のレベルで結合した (1.2-10.0 μg/ml)。

血液中で抗菌ペプチドや抗菌ステロイドが好中球に作用するかどうかを知る目的で全血化学発光法による活性の変化を調べた。CAP18/LL37 および CSA-13 はチモゼン刺激によって誘導される反応を濃度依存性に増強した。

CAP18/LL37 および CSA-13 は血管内皮細胞のチューブ形成を抑制した。すなわち、分岐ポイント数、1 分岐ポイントからの平均分岐数、形成されたチューブの長さはいずれも CAP18/LL37 および CSA-13 によって抑制された (図 4)。これらの活性は濃度依存性であった。

D. 考察

カセリシジンファミリーの抗菌ペプチドは免疫機構への作用が示唆されており、抗菌活性と免疫機構に対する作用を併せ持つことでベーチェット病の炎症制御を有効に行えらると思えられる。そもそも、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ものである。粘膜上皮からの産生が見られないような場合でも遺伝子導入によって、自然免疫の強化が実現できるといえる。iPS 細胞を移植のために特定の細胞に分化させ臨床応用することは将来可能になるだろう。その際、ビタミン剤を添加するように CAMP 遺伝子を細胞に導入すれば抵抗性の賦与ができる。特に、粘膜面系への防御に有効かもしれない。

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1000mg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やその菌体構成物(LPS, LTA)に対しCAP18/LL37と同様の活性を持つことが明らかとなった。さらに、好中球や血管内皮細胞に対してもCAP18/LL37と同様の活性を示した。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, 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
2. 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
3. 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, 近代出版, 2006

4. 磯貝恵美子, 磯貝 浩: ライム病, p.218-226, 人獣共通感染症(清水実嗣監修), 養賢堂, 2007

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
2. 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, 2006
3. 磯貝恵美子: ボレリア (p.149-150), ライム病 (p.151-152), 獣医感染症カラーアトラス第2版, 文永堂出版
4. 金子史男, 尾山徳孝, 磯貝恵美子: 口内炎, ペーチェット病, JOHNS 22(12), 1757-1763, 2006
5. 磯貝恵美子, 磯貝 浩, 自然免疫における抗菌ペプチドの機能, ダニ研究2, 1-3, 2007
6. 磯貝恵美子, 発展途上国でのeラーニングシステムとそのサポート, 北海道医療大学情報センター年報, 2007, in press

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-Bechet'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. 林 俊治, 磯貝恵美子, 平井義一 歯科診療ユ

- ニットの水の管理, 臨床医 31 (8), 1468-1472, 2005
6. Isogai E, Makungu C, Yabe J, Sinkala P, Nambota A, Isogai H, Fukushi H, Silungwe M, Mubita 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
 7. 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. Intern J Appl Res Vet Med, 3(4), 367-371, 2005
 8. 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. 72(2):1102-1109, 2006
 9. 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
 10. 西川武志, 小林菜津美, 岡安多香子, 山田玲子, 磯貝恵美子, 磯貝 浩, 山下利春 茶およびカテキン含有飲料の病原性大腸菌に対する増殖抑制効果の検討, 腸内細菌学雑誌, 20 (4) : 321-327, 2006
 11. 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 Microbiol Lett, 264(2): 238-245, 2006
 12. 磯貝恵美子, 西川武志, 磯貝 浩, 磯貝なゆた, 榎林陽一, 林 俊治 家庭内における除菌のための手洗い効果と環境表面からの細菌の検出, 環境感染, 22 (3) : 175-180, 2007
 13. 磯貝恵美子, 小林美智代, 奥村一彦, 磯貝 浩, 榎林陽一, 林 俊治 歯科病院環境の真菌学的検討-病院環境における *Stachybotrys chartarum*, *Aspergillus niger*, *Chaetomium funicola* の分離, 環境感染, 22, 2007 (in press)
 14. Han'gombe BM, Isogai E, Mubita C, Isogai N, Silungwe M, Chisenga C, Moonga L, Mulenga E, Yabe J, Takaya A, Yamamoto T, Kurebayashi Y, Isogai H, Detection of InvA, SpiC, SipC, InvF and HilA in Salmonella isolated from beef and poultry by Dot Blot Hybridization in Zambia, Int J Appl Res Vet Med, 2007 (in press)
 15. Mizugai H, Isogai E, Hirose K, Chiba I. Effect of denture wearing on occurrence of *Candida* species in the oral cavity. J Appl Res, 7(3): 250-254, 2007
- ## 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
 4. 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.
 5. Okumura K, Muraoka K, Tanimura A, Isogai E, Hosokawa Y, Itoh A, Shibata T, Isogai H. The hCAP18 induces Ca²⁺ release from endoplasmic reticulum. IADR June 28-July 1, 2006, Brisbane, Australia

6. Isogai E, Isogai H, Kaneko F, Ohno S. New biomarker evidence of oxidative stress in serum and whole saliva. 12th ICB, September 20-23, 2006, Lisbon, Portugal
7. 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 ICB, September 20-23, Lisbon, Portugal
8. 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
9. Kawahara M, Rikihisa Y, Tajima T, Torii H, Harasawa M, Isogai E, New Ehrlichia sp. closely related to Ehrlichia chaffeensis and high prevalence of three anaplasma spp. infection in deer from Nara Park, Japan, ASM, General 107th Meeting, May 21-25, 2007, Toronto, Canada
10. Isogai H, Isogai E, Gingival damages and oxidative stress in canine periodontitis, ASM, General 107th Meeting, May 21-25, 2007, Toronto, Canada
11. Isogai E, Isogai H, Molecular analysis of bacterial flora associated with canine periodontitis. ASM,

General 107th Meeting, May 21-25, 2007, Toronto, Canada

12. Takahashi K, Isogai H, Isogai E, Kawai K. BMAP-28, a cathelicidin family antimicrobial peptide, exhibits antimicrobial activity against isolates from milk of cows with mastitis. ASM, General 107th Meeting, May 21-25, 2007, Toronto, Canada
13. Isogai E. Tick biology and tick-borne diseases. The 17th Annual Staff & Students Conference, June 29-30, 2007, Gondar, Ethiopia (invitation)
14. Mulu A, Diro E, Kassu A, Isogai E, Nishikawa T, Ota T. A preliminary study on isolation and identification of Candida species from the oral cavity of patients with HIV infection, Addis Ababa. The 17th Annual Staff & Students Conference, June 29-30, 2007, Gondar, Ethiopia

H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得

平成18年「インターフェロン α を含む口腔組成物」

提出日：2006年1月12日

出願番号：特願2006-4526

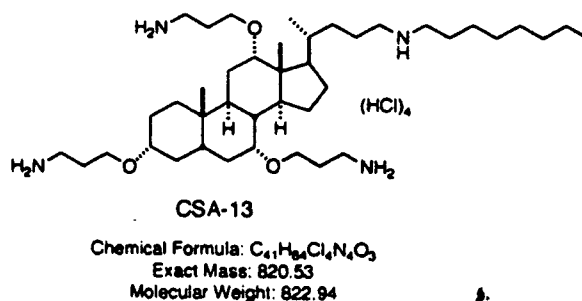
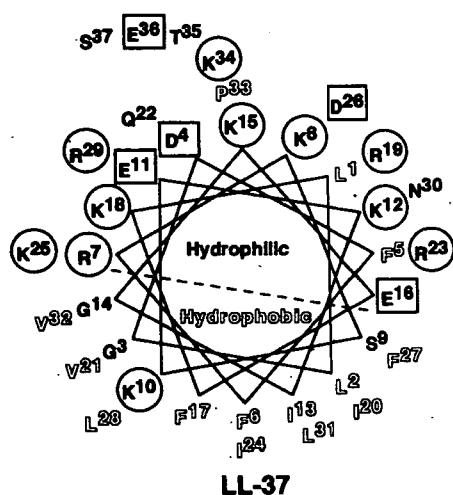


図1. 抗菌ペプチド（活性ドメイン LL-33）および抗菌ステロイド CSA-13の構造
 カチオン性という性状は一致するが、構造は全く異なる

CAMP 遺伝子の導入

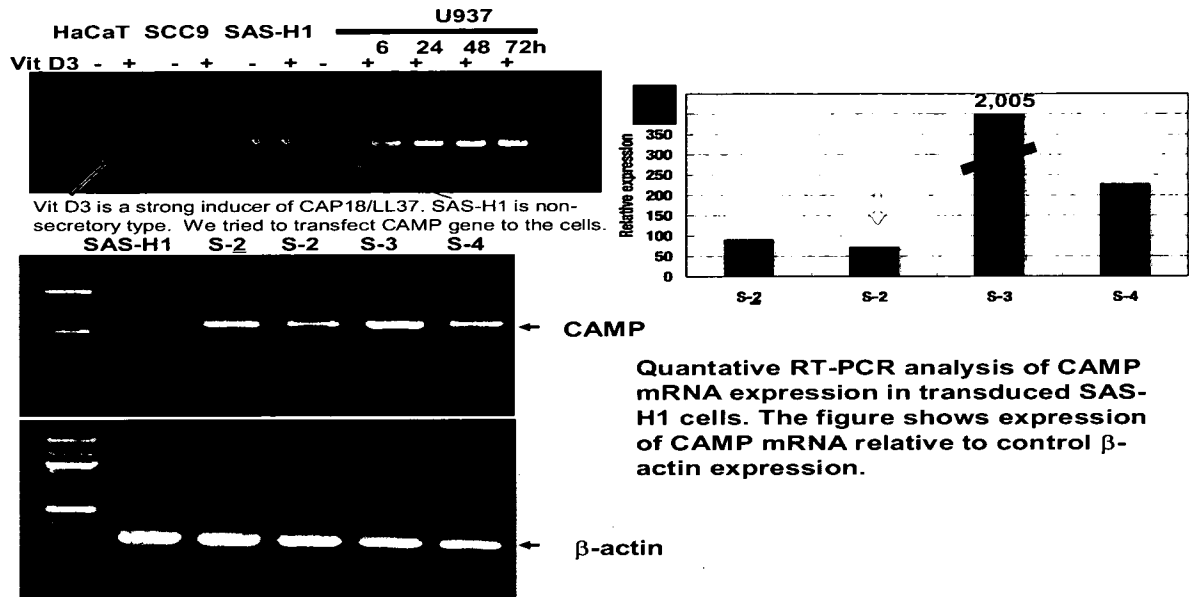
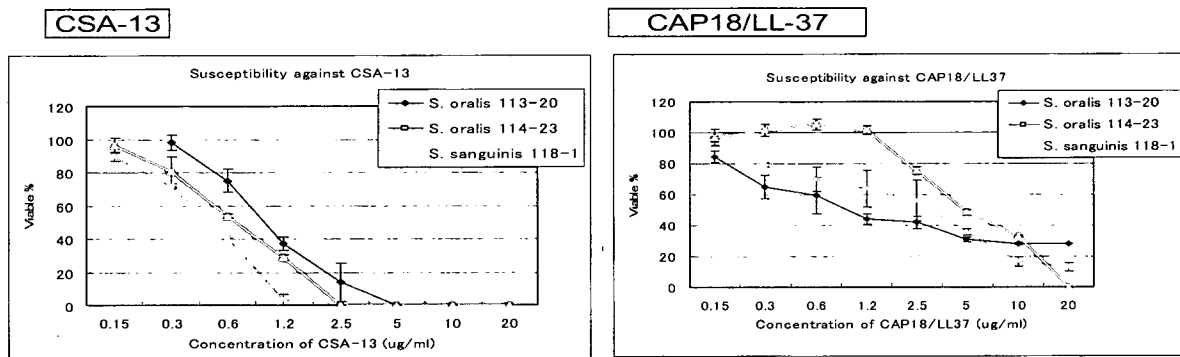


図2. CAMP 遺伝子導入のための細胞株選択と SAS-H1 への遺伝子導入

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. ペ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

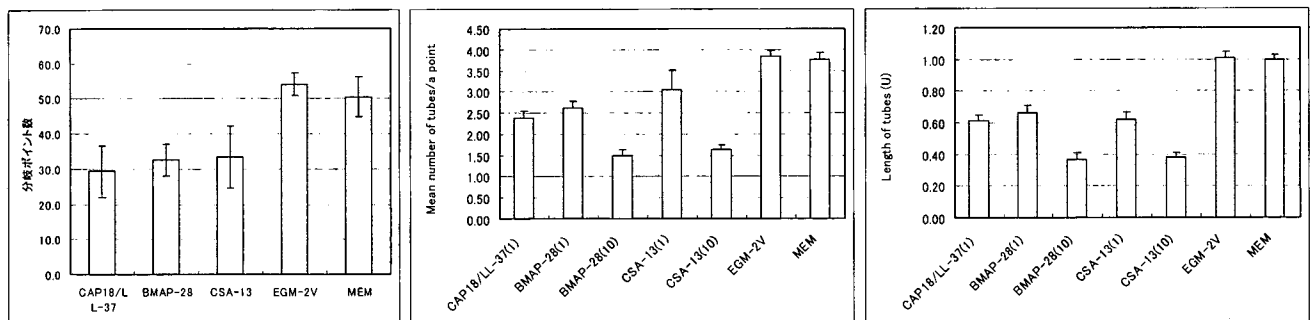


図4. CAP18/LL37 および CSA-13 による血管内皮細胞のチューブ形成の抑制すなわち、左から分岐ポイント数、1分岐ポイントからの平均分岐数、形成されたチューブの長さ

ベーチェット病における末梢血 NK 細胞の役割

分担研究者 桑名 正隆 (慶應義塾大学内科准教授)
研究協力者 山口 由衣 (横浜市立大学皮膚科大学院生)
高橋 一夫 (横浜市立大学皮膚科准教授)
池澤 善郎 (横浜市立大学皮膚科教授)
水木 信久 (横浜市立大学眼科教授)

研究要旨

NK 細胞はサイトカイン分泌パターンにより Th1・Th2類似の NK1 (IFN- γ ↑, IL-12R β 2↑, IL-10↑)・NK2細胞 (IL-5↑, IL-13↑, IL-12R β 2↓) に分類され, 細胞傷害作用のみならず獲得免疫応答を調節することが知られている. ベーチェット病 (BD) の病態における NK 細胞の役割を追究するため, 活動期および非活動期 BD 患者の末梢血 NK 細胞を用いて検討し, 以下の知見を得た. BD 患者 NK 細胞は活動期, 非活動期ともに CD69⁺細胞比率が増加し, 活性化していた. 免疫調節遺伝子発現解析から, 非活動期 BD 患者では NK 細胞における IL-12R β 2 の mRNA 発現低下, IL-13発現上昇を認め, 健常人および活動期 BD 患者に比較して NK2に偏倚していた. 非活動期 BD 患者 NK 細胞は IL-12刺激後に下流シグナル分子 Stat4のリン酸化効率が低く, IL-12シグナル伝達の低下を認めた. さらに, 活動期 BD 患者由来 T 細胞との共培養により, 非活動期 BD 患者 NK 細胞が活動期 BD 患者 T 細胞における IFN- γ 発現を低下させることが示された. 以上より, 非活動期 BD 患者では, NK 細胞が NK2に偏倚しており, それらは液性因子を介して BD の Th1病態を抑制する可能性が示された.

A. 研究目的

ベーチェット病 (BD) は口腔内アフタ, 外陰部潰瘍, 眼ぶどう膜炎, 皮膚症状を主徴とした全身性炎症性疾患である. BD 患者では CD4⁺T 細胞の Th1への偏倚, CD8⁺T 細胞や $\gamma\delta$ T 細胞など細胞傷害性リンパ球の活性化などが知られているが, その病態は依然明らかでない. 細胞傷害性リンパ球の一つである NK 細胞は Th1, Th2類似のサイトカイン分泌を示す NK1, NK2へと分化することで, サイトカイン分泌を介して獲得免疫応答を調節することが近年示された. そこで, BD の病態における NK 細胞の役割について検討した.

B. 研究方法

1. 対象

厚生労働省研究班の診断基準 (2003年改訂) を満たすベーチェット病38例. 活動性眼病変を有する患者を活動期 (n=6), それらを持たない症例

を非活動期 (n=32) とした. またコントロールとして健常人22例を用いた.

2. 活性化 NK 細胞の検出

比重遠心法により分離した末梢血単核球を CD3, CD56, CD69に対するモノクローナル抗体を用いて多重染色し, フローサイトメトリーにより解析した.

3. NK 細胞の遺伝子発現解析

CD3⁻CD14⁻CD56⁺ NK 細胞を用いて IL-5, IL-10, IL-13, IFN γ , IL12R β 2の遺伝子発現を PCR および Taqman[®] プローブを用いた定量的 PCR 法により検出した.

4. NK 細胞における IL-12シグナル解析

NK 細胞をリコンビナント IL-12で30分間刺激し, Stat4およびリン酸化 Stat4の発現を免疫プロットにより半定量的に解析した.

5. NK 細胞による T 細胞の IFN- γ 発現調節の検討

活動期 BD より分離した CD3⁺CD56⁻T 細胞を非活動期 BD 患者および健常人由来の NK 細胞と

ともに、 $0.4\mu\text{m}$ 穴のチャンバーを介して12時間共培養し、 CD4^- および CD4^+ T 細胞における $\text{IFN-}\gamma$ 発現レベルをフローサイトメトリーで検出した。

6. 統計学的解析

2群間の分布差は Mann-Whitney U-test を用いて検定した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

BD 患者 NK 細胞は活動期、非活動期ともに CD69^+ 細胞比率が増加し、活性化していた。免疫調節遺伝子発現解析から、非活動期 BD 患者では NK 細胞における $\text{IL-12R}\beta 2$ の mRNA 発現低下、 IL-13 発現上昇を認め、健常人および活動期 BD 患者に比較して NK2 に偏倚していた。非活動期 BD 患者 NK 細胞は IL-12 刺激後に下流シグナル分子 Stat4 のリン酸化効率が低く、 IL-12 シグナル伝達の低下を認めた。さらに、活動期 BD 患者由来 T 細胞との共培養により、非活動期 BD 患者 NK 細胞が活動期 BD 患者 CD4^- および CD4^+ T 細胞における $\text{IFN-}\gamma$ 発現を低下させた (図)。

D. 考 察

非活動期 BD 患者の NK 細胞は $\text{IL12R}\beta 2$ 低発現、 IL-13 高発現、 IL-12 シグナル伝達低下の NK2 に偏倚し、活動期にこの傾向が消失した。さらに、今回患者検体を用いて非活動期の BD 患者の NK 細胞が、活動期 BD 患者の T 細胞の $\text{IFN-}\gamma$ 発現レベルを低下させることを初めて示した。細胞の移動のない膜を介した実験系であることから、NK2 細胞由来の液性因子が T 細胞における $\text{IFN}\gamma$ 発現に影響を与えていた。以上より、NK2 に偏倚した非活動期 BD 患者の NK 細胞は、T 細胞からの $\text{IFN-}\gamma$ 産生を抑制することが示され、BD の疾患活動性をコントロールしていることが示唆された。

E. 結 論

非活動期 BD 患者末梢血 NK 細胞は、NK2 に偏倚し、液性因子を介して T 細胞からの $\text{IFN-}\gamma$ 産生を低下させることで、BD の Th1 病態を抑制し、疾患活動性をコントロールしている可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

論文発表

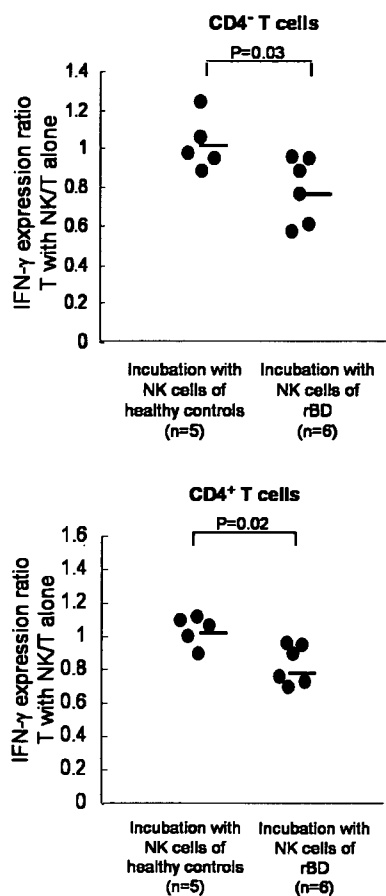
1. 桑名正隆：膠原病のプライマリケア・早期診断と治療指針；ベーチェット病. 総合臨床 56 (3) : 524-529, 2007.
2. Yasuoka H, Yamaguchi Y, Mizuki N, Nishida T, Kawakami Y, and Kuwana M. Preferential activation of circulating CD8^+ and $\gamma\delta\text{T}$ cells in patients with active Behçet's disease and HLA-B51. *Clin. Exp. Rheumatol.* In press

学会発表

1. 山口由衣, 佐藤隆司, 高橋一夫, 池澤善郎, 桑名正隆：NK 細胞がベーチェット病の Th1 病態を制御する。第51回日本リウマチ学会総会 (横浜). 2007. 4.
2. Kuwana M: Roles of cytotoxic lymphocytes in pathogenesis of Behçet's disease. Japan and Korea Joint Meeting on Behçet's Disease (Yokohana). 2007. 7.
3. Yamaguchi Y, Takahashi H, Satoh T, Mizuki N, Takahashi K, Ikezawa Z, Kuwana M: Natural killer cells control a pathogenic Th1 response in patients with Behçet's disease. The 71th Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology (Boston). 2007. 11.

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし



図

末梢血NK細胞との共培養が活動期BD患者CD4⁻およびCD4⁺T細胞のIFN- γ 発現に及ぼす影響。非活動期BD患者(rBD)または健常人NK細胞との共培養後の活動期BD由来T細胞におけるIFN- γ 発現。IFN- γ 発現レベルはT細胞のみのコントロールに対する比で表した。各群の平均を横線で示す。

ベーチェット病における免疫異常及び炎症病態に関する研究

分担研究者 鈴木 登 (聖マリアンナ医科大学医学部免疫学・病害動物学教室)
研究協力者 黒川真奈絵 (聖マリアンナ医科大学医学部免疫学・病害動物学教室)
奈良 和彦 (聖マリアンナ医科大学医学部免疫学・病害動物学教室)
吉川 英志 (聖マリアンナ医科大学医学部免疫学・病害動物学教室)
松田 隆秀 (聖マリアンナ医科大学医学部総合診療内科学教室)
野中 信宏 (聖マリアンナ医科大学医学部総合診療内科学教室)
池島 秀明 (昭和薬科大学薬学部薬物治療学教室)
金子 栄 (島根大学医学部皮膚科学教室)
森田 栄伸 (島根大学医学部皮膚科学教室)

研究要旨

ベーチェット病 (BD) の皮膚及び腸管病変部で Th1型サイトカイン・ケモカイン, 炎症性サイトカイン及びそれらの受容体の発現亢進を認めた. また同病変部において Toll like receptor (TLR) 2, TLR4 と heat shock protein 60 (HSP) 60 の発現を認め, 単球/マクロファージ上のこれらの TLR 分子を介した刺激が炎症性サイトカインを産生させ, Th1優位の免疫異常を惹起すると考えられた. TLR2・TLR4 からの刺激を阻害すると TNF α や IL-1 β の産生が低下する傾向を認め, これらの阻害により疾患特異的な治療法が確立できる可能性が示された. 神経ベーチェット病では血清中より脳脊髄液中の TNF α が有意に高値を示し, 炎症の主座は中枢神経にあり全身的な炎症の波及ではないことが示された. 脳脊髄液の検索にて TNF α を検出した症例では活性化マクロファージの表面分子である CD68 も検出されたが, 流血中の単球・T細胞・B細胞に発現する CD14・CD3・CD20 及びアストログリアに発現する glial fibrillary acidic protein は検出されず, 中枢神経内のミクログリアが TNF α を産生し炎症の主役を務めると考えられた. BD の免疫異常及び炎症病態を網羅的に解析するため, 完全型及び腸管型ベーチェット病患者の末梢血単核球における個々の蛋白の発現量を健常人と比較した. 1,300 を超える発現蛋白のうち完全型ベーチェット病で有意に2倍以上発現が上昇している蛋白を43個, 1/2以下に低下している蛋白を64個認めた. BD の末梢血単核球における蛋白発現には健常人と明らかな相異があり, これらの蛋白を同定することにより病因・病態を解明できる可能性がある.

A. 研究目的

ベーチェット病 (BD) の皮膚, 腸管, 中枢神経の病変部における免疫異常・炎症病態について, Th1関連分子や炎症性サイトカイン, また自然免疫に関与する Toll like receptor (TLR) の発現を解析し, 各病変部に普遍的または特異的な病態機構を明らかにする. さらに上記分子に止まらず網羅的に BD の病態を調べるため, 末梢血単核球由来の個々の蛋白の発現量を解析し, 健常人と比較検討する.

B. 研究方法

BD の皮膚病変部と末梢血, 対照疾患の正常部皮膚と末梢血のペア検体より, RT-PCR にてサイトカイン, ケモカインとその受容体, HSP60, TLR の発現を検討した. 腸管ベーチェット病 (IBD) 及びクローン病の病変部組織にて, RT-PCR 及び免疫染色により TLR, HSP60 の発現と発現細胞の同定を行った. 一部の BD 患者末梢血では TLR2 および TLR4 に対する特異抗体とビタミン D3 を用いてこれら TLR 分子を阻害し, 炎症性サイトカインの産生に与える影響を ELISA に

て調べた。神経ベーチェット病 (NBD) および対照疾患の脳脊髄液と血清のペア検体で、炎症性サイトカイン、HSP60と抗HSP60抗体の濃度をELISAにて測定した。NBDの脳脊髄液よりRNAを抽出し、炎症性サイトカインとその産生細胞に特異的なプライマーを用いnested RT-PCRを施行した。完全型ベーチェット病 (CBD)、IBDと対照健常人より末梢血単核球を分離し、得られた蛋白を2次元電気泳動にて展開して個々の蛋白の発現量を患者と健常人間で比較した。

(倫理面への配慮)

上記の研究は臨床試験として聖マリアンナ医科大学生命倫理委員会にて承認された後、全ての患者および健常人に文書による同意を得て検体を採取した。

C. 研究結果

BDの皮膚病変部ではIFN γ 、CCR5、MIP1 β 、IL-12、IL-12受容体、TNF α の発現が見られ、腸管病変部と同様Th1に偏位した免疫異常が認められた。上記分子は正常部皮膚には発現していなかったが、HSP60とMIP1 α はBD及び正常部皮膚の両方で発現していた。BDの末梢血、皮膚及び腸管病変部では検討したほぼ全例においてTLR2・TLR4の発現が見られたが、非活動期の皮膚病変部及び同一患者の腸管非病変部では、これらの発現を認めなかった。IBD、クローン病とも検討した全例においてTLR2、TLR4を発現していた。BDの腸管病変部でTLR2を発現している細胞はCD68陽性のマクロファージであり、これらは全てIL-12を発現し、HSP60陽性細胞と近接していた。またTLR2陽性マクロファージの一部に、CD3陽性T細胞と近接している像を認めた。患者末梢血中のTLR2及びTLR4を特異抗体またはビタミンD3にて阻害すると、ビタミンD3にてTLR2を介したTNF α の産生が、抗TLR4抗体によりTLR4を介したIL-1 β の産生が抑制された。

NBDではELISAの結果、脳脊髄液中のTNF α が血清中に比較し有意に上昇しており ($p < 0.002$)、全て健常人血清値より高値を示した。IL-6は慢性進行型1例の脳脊髄液で高値を示したが、他の例では健常人血清値と同程度であった。

HSP60は健常人血清値と同程度であり、抗HSP60抗体はNBDの血清中で脳脊髄液より有意に高値であった ($p < 0.00005$)。IFN γ はNBDの血清1例のみで検出された。nested RT-PCRの結果では、NBD4例中3例の脳脊髄液よりTNF α が検出され、同3例で活性化マクロファージの表面分子であるCD68を検出した。IL-6、主として流血中の単核球に発現するCD14、T細胞に発現するCD3、B細胞に発現するCD20は、いずれも検出されなかった。アストログリアに発現するglial fibrillary acidic protein (GFAP)も全例において認められなかった。

CBD3例、IBD2例、及び患者と性・年齢の一致した健常人5例より末梢血を採取し、単核球を分離して蛋白を抽出した。2次元電気泳動の結果、CBDの解析では患者と健常人計6例に共通して認められた蛋白スポットは1,362個であり、そのうち有意差をもって患者で発現が上昇していた蛋白は2倍以上が43個、3倍以上が17個であった。また有意差をもち患者で発現が低下していた蛋白を1/2以下で64個、1/3以下で37個認めた。IBDの解析では、患者と健常人計4例に共通して認められた蛋白スポットは2,714個であり、そのうち患者で共通に発現が上昇した蛋白を2倍以上23個、3倍以上2個、患者で共通に発現が低下した蛋白を1/2以下で75個、1/3以下で23個認めた。

D. 考 察

我々はBDの皮膚・腸管病変部におけるHSP60の過剰発現を示してきた。これは感染や炎症の継続によるストレス性病態の存在を示すが、HSPは種間の相同性が高く、BDが特定の病変部で繰り返し症状の増悪を示すことを考えると、微生物の感染による交差反応を契機とした自己免疫応答の遷延化が、病態形成に深く関与していることが示唆される。HSP60の受容体となるTLR2およびTLR4が非活動期例を除くBDのほぼ全例で発現しており非病変部で認められなかったことは、これら分子の病態への関与を強く示唆する。皮膚・腸管病変部でTh1関連分子やIL-12、TNF α 等の炎症性サイトカインの発現を認めたこと、及びTLR2陽性マクロファージがIL-12を発現しHSP60

産生細胞及びT細胞と近接していたことから、以下の病態機構が考えられる。即ち、BD病変部単球・マクロファージ上のTLR2・TLR4は初期には感染微生物由来のHSPを認識するが、その後炎症の遷延化により過剰発現した自己抗原HSP60に反応し、自身を発現する単球・マクロファージにIL-12やTNF α 等の産生を促す。このIL-12によりIL-12受容体を発現したT細胞がTh1細胞へと分化され、IFN γ を産生する。同時にこのTh1細胞はCCR5を発現しMIP1 β 及びMIP1 α を認識し炎症部位に遊走する。またT細胞に近接した単球・マクロファージは、HSP60を抗原として提示する。BD患者のT細胞中に、HSP60由来ペプチドに反応性のものが検出されている。このようにHSP60は自然免疫系から獲得免疫系に至るまでBDの免疫異常に広く関わると考えられる。ビタミンD3及び特異抗体を用いたTLR2・TLR4の阻害によりTNF α やIL-1 β の産生低下を認めたことから、これらの投与により疾患特異的な治療法を確立できる可能性が示された。

これに対して、BDの神経病変部の病態機構はTNF α による炎症が主体であり、T細胞・B細胞等の獲得免疫系の関与は少ないと考えられる。NBDでは対照疾患と異なり、炎症の主座は中枢神経にあり、全身的な炎症の波及ではないことが示唆された。IL-6の脳脊髄液中の濃度は慢性進行型1例を除き、殆どの例で上昇を認めなかった。TNF α を産生するのは中枢神経内で活性化されたマクロファージ系の細胞であることが示されたが、GFAP陽性細胞の関与は否定的であった。このことからTNF α 産生能を有し抗原提示にも預かる中枢神経内のミクログリアの関与が最も強く考えられ、近年報告が集積されている通り、NBDに対して抗TNF α 療法が著効することが示唆された。

以上、BDの病態機構を免疫異常と炎症の観点から解析してきたが、これまでの方法では既報の関連分子を標的とした研究に止まり、未知の分子を含めた全体的な病像を把握しきれない可能性が残る。このためプロテオミクスの手法によりBDと健常人の差異を網羅的に解析する研究を開始した。CBD及びIBDの末梢血単核球において健常人と明らかな発現量の差を示す蛋白があり、これ

らを同定することにより病因・病態を解明できる可能性が示された。また複数の蛋白の発現の増減を組み合わせたパターンの解析から、クローン病や潰瘍性大腸炎等との鑑別診断が容易に行える可能性も示唆された。

E. 結 論

BDの皮膚・腸管病変部ではHSP60の過剰産生とTh1に偏位した免疫異常が、神経病変部では中枢神経内のミクログリアが産生するTNF α が主体となり、炎症病態を形成することが示唆された。前者ではTLR2・TLR4の阻害による特異的治療の可能性があり、後者では抗TNF α 療法が著効すると考えられる。またBD患者の発現蛋白を網羅的に解析することで、病態に関与する未知の分子や機構が明らかとなり、BDの病因を解明し鑑別診断を容易にする可能性が示された。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Chiba S, Kurokawa SM, Yoshikawa H, Ikeda R, Takeno M, Tadokoro M, Sekino H, Hashimoto T, Suzuki N. Noggin and basic FGF were implicated in forebrain fate and caudal fate, respectively, of the neural tube-like structures emerging in mouse ES cell culture. *Exp Brain Res* 163: 86-99, 2005.
2. Kitagawa A, Nakayama T, Takenaga M, Matsumoto K, Tokura Y, Ohta Y, Ichinohe M, Yamaguchi Y, Suzuki N, Okano H, Igarashi R. Lecithinized brain-derived neurotrophic factor promotes the differentiation of embryonic stem cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 328(4): 1051-1057, 2005.
3. Ikeda R, Kurokawa SM, Chiba S, Yoshikawa H, Ide M, Tadokoro M, Nito S, Nakatsuji N, Kondoh Y, Nagata K, Hashimoto T, Suzuki N. Transplantation of neural cells derived from retinoic acid-treated cynomolgus monkey embryonic stem cells successfully improved motor function of hemiplegic mice with experimental brain injury. *Neurobiology*

- of Disease 20(1): 38-48, 2005.
4. Ide M, Ueda Y, Watanabe K, Kurokawa MS, Yoshikawa H, Sakakibara M, Hashimoto T, Suzuki N. Characterization of intracellular free Ca²⁺ movements in neural progenitor cells derived from ES cell transfected with MASH1 transcription factor gene. *Inflammation and Regeneration* 25(5): 452-460, 2005.
 5. Nagafuchi H, Takeno M, Yoshikawa H, Kurokawa SM, Nara K, Takada E, Masuda C, Mizoguchi M, Suzuki N. Excessive expression of Txk, a member of Tec family tyrosine kinases, contributes to excessive Th1 cytokine production by HSP reactive T lymphocytes in patients with Behcet's disease. *Clinical and Experimental Immunology* 139(2): 363-370, 2005.
 6. Imamura Y, Kurokawa SM, Yoshikawa H, Nara K, Takada E, Masuda C, Tsukikawa S, Ozaki T, Matsuda T, Suzuki N. Involvement of Th1 cell and heat shock protein 60 in the pathogenesis of intestinal Behcet's Disease. *Clinical and Experimental Immunology* 139(2): 371-378, 2005.
 7. 鈴木登, 鈴木知子. ベーチェット病と Toll-like receptor. *医学のあゆみ* 215 (1) : 23-27, 2005.
 8. 鈴木登. Th1細胞動態の up to date. Th1細胞特異的な Tec family チロシンリン酸化酵素 (Txk) を介した自己免疫疾患の制御. *Surgery Frontier* 12 (4) : 72-74, 2005.
 9. Suzuki N, Nara K, Suzuki T. Skewed Th1 responses caused by excessive expression of Txk, a member of Tec family tyrosine kinases in patients with Behcet's disease. *Clinical Medicine and Research* 4(2): 147-151, 2006.
 10. Hamada M, Yoshikawa H, Ueda Y, Kurokawa MS, Watanabe K, Sakakibara M, Akashi K, Aoki H, Suzuki N. Introduction of MASH1 gene into mouse embryonic stem cells leads to differentiation of motoneuron precursors lacking Nogo receptor expression that can be applicable for transplantation to spinal cord injury. *Neurobiology of Disease* 22(3): 509-522, 2006.
 11. Kamochi H, Kurokawa SM, Yoshikawa H, Ueda Y, Masuda C, Takada E, Watanabe K, Sakakibara M, Natuki Y, Kimura K, Beppu M, Aoki H, Suzuki N. Transplantation of myocyte precursors derived from embryonic stem cells transfected with IGFII gene in a mouse model of muscle injury. *Transplantation* 82(4): 516-526, 2006.
 12. Yoshikawa H, Kurokawa SM, Ozaki N, Nara K, Atou K, Takada E, Kamochi H, Suzuki N. Nicotine inhibits the production of proinflammatory mediators in human monocytes by suppression of I- κ B phosphorylation and NF- κ B transcriptional activity through nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$. *Clinical and Experimental Immunology* 146(1): 116-123, 2006.
 13. Yoshikawa H, Nara K, Suzuki N. Recent advances in neuro-endocrine-immune interactions in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Current Rheumatology Reviews* 2: 193-207, 2006.
 14. 鈴木登. 胚性幹細胞の臨床応用の可能性. *聖マリアンナ医科大学雑誌* 34: 187-190, 2006.
 15. Nagaya M, Kubota S, Suzuki N, Akashi K, Mitaka T. Thermoreversible gelation polymer induces the emergence of hepatic stem cells in the partially injured rat liver. *Hepatology* 43(5): 1053-1062, 2006.
 16. 野中信宏, 池島秀明, 黒川真奈絵, 高田えりか, 中野弘雅, 大岡正道, 今村愉子, 松田隆秀, 鈴木登. 神経ベーチェット病患者の病態形成における炎症性サイトカインの果たす役割. *聖マリアンナ医科大学雑誌* 34(4): 257-267, 2006.
 17. Atoh K, Kurokawa MS, Yoshikawa H, Masuda C, Takada E, Kumagai N, Suzuki N. Induction of melanocyte precursors from neural crest cells surrounding the neural tube like-structures developed in vitro using mouse ES cell culture. *Inflammation and Regeneration* 27(1): 45-52, 2007.
 18. Maruyama T, Nara K, Yoshikawa H, Suzuki N. Txk, a member of the non-receptor tyrosine kinase of the Tec family, forms a complex with poly (ADP-ribose) polymerase 1 and elongation factor 1 α and regulates interferon-g gene transcription in Th1 cells. *Clinical and Experimental Immunology* 147(1): 164-175, 2007.
 19. Takenaga M, Ohta Y, Tokura Y, Hamaguchi A,

- Suzuki N, Nakamura M, Okano H, Igarashi R. Plasma as a scaffold for regeneration of neural precursor cells after transplantation into rats with spinal cord injury. *Cell Transplantation* 16(1): 57-65, 2007.
20. Mihara S, Suzuki, N. Role of Txk, a member of Tec family tyrosine kinases, in immune-inflammatory diseases. *International Reviews of Immunology* (26): 1-15, 2007.
21. Ueno H, Kurokawa MS, Kayama M, Homma R, Kumagai Y, Masuda C, Takada E, Tsubota K, Ueno S, Suzuki N. Experimental transplantation of corneal epithelium-like cells induced by PAX6 gene transfection of mouse embryonic stem cells. *Cornea* 2007, in press.
22. 黒川真奈絵, 田子玲子, 高田えりか, 奈良和彦, 鈴木登. マウス胚性幹細胞由来血管内皮細胞および壁細胞の分化誘導. 聖マリアンナ医科大学雑誌 35: 143-149, 2007.
23. 熊谷悠太, 上野宏樹, 鈴木登. 角膜再生治療の現状とカニクイザル胚性幹細胞を用いた角膜上皮細胞移植研究. 聖マリアンナ医科大学雑誌 35 (2) : 109-117, 2007.
24. 鈴木登, 高井憲治. 基礎医学教育の現状と課題. 聖マリアンナ医科大学雑誌 35 (増刊号): S45-S47. 2007.
25. 吉川英志, 鈴木登. ニコチンによる炎症メディエーターの産生抑制. *臨床免疫・アレルギー科* (48) 2: 182-188, 2007.
26. 黒川真奈絵, 尾崎志雲, 吉川英志, 鈴木登. 阻血再灌流後の腎組織障害に対する Fas 依存性アポトーシス抑制による治療効果. *Inflammation and Regeneration* 27 (2) : 124-129, 2007.
27. Kurokawa MS, Suzuki N. Behcet's Disease. *Current Research in Immunology* 2007, in press.
28. Kayama M, Kurokawa MS, Ueno H, Suzuki N. Recent advances of corneal regeneration and possible application of embryonic stem(ES)cell derived corneal epithelial cells. *Clin Ophth* 2007, in press.
29. 鈴木登. 免疫グロブリン. 臨床アレルギー学 改訂第3版. 南江堂. 15-27, 2007.
30. 鈴木登. 在宅看護・介護のための難病ガイド 改訂第2版「原発性免疫不全症候群」. 日本医学出版. 印刷中
31. 鈴木登. 在宅看護・介護のための難病ガイド 改訂第2版「特発性好酸球増多症候群」. 日本医学出版. 印刷中
32. 鈴木登. 免疫不全の分子機構. わかりやすい内科学 第3版. 文光堂. 印刷中

2. 学会発表

1. 陳志雲, 吉川英志, 黒川真奈絵, 鈴木登. 単核球に発現されるニコチンアセチルコリン受容体の機能. 第35回日本免疫学会. 2005.
2. 奈良和彦, 黒川真奈絵, 吉川英志, 金子栄, 森田栄伸, 松田隆秀, 鈴木登. ベーチェット病の病態形成における自然免疫の役割. 第35回日本免疫学会. 2005.
3. 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分化誘導とメラノサイトへの最終分化. 第8回日本組織工学会. 2005.
4. 蒲地宏昌, 黒川真奈絵, 吉川英志, 渡辺憲史, 榊原学, 青木治人, 鈴木登. ES細胞へのIGFII遺伝子導入による筋系細胞の分化誘導一筋損傷及び筋疾患モデルマウスへの移植治療. 第26回日本炎症・再生医学会. 2005.
5. 阿藤晃一, 吉川英志, 黒川真奈絵, 熊谷憲夫, 鈴木登. マウス胚性幹細胞由来神経堤細胞からのメラノサイトの分化誘導. 第26回日本炎症・再生医学会. 2005.
6. 尾崎志雲, 吉川英志, 黒川真奈絵, 鈴木登. 単核球における炎症性メディエーター発現のニコチンによる抑制. 第26回日本炎症・再生医学会. 2005.
7. 井手路子, 黒川真奈絵, 池田律子, 吉川英志, 今井俊夫, 橋本卓雄, 鈴木登. 胚性幹細胞由来神経前駆細胞による損傷脳の移植治療. 第26回日本炎症・再生医学会. 2005.
8. Homma R, Yoshikawa H, Kurokawa MS, Masuda C, Takada E, Ueno H, Tsubota K, Ueno S, Suzuki N. Experimental Transplantation of Corneal Epithelium Induced by PAX6 Gene Trnsfection to Mouse Embryonic Stem (ES) Cell. *Association for Research in Vision and Ophthalmology*. USA 2005.

9. 黒川真奈絵, 吉川英志, 松田隆秀, 鈴木登. 神経ベーチェット病患者の脳脊髄液中の熱ショック蛋白 (HSP60) および炎症性サイトカインの解析. 第49回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2005.
10. 吉川英志, 今村愉子, 黒川真奈絵, 奈良和彦, 松田隆秀, 鈴木登. 腸管型ベーチェット病の病態における Th1免疫応答と熱ショック蛋白60の関与. 第49回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2005.
11. 櫻井謙, 田嶋朝子, 飯塚佐代子, 沈勁松, 孟興麗, 鈴木登, 大橋十也, 衛藤義勝. ES細胞由来神経前駆細胞のマウス脳室内移植によるリソゾーム蓄積症の治療法の開発. 第108回日本小児科学会. 2005.
12. 長屋昌樹, 窪田倭, 鈴木登, 明石勝也, 三高俊広. 温度感应性ハイドロゲル (TGP) を充填した肝小欠損創における新しい再生のメカニズムと肝前駆細胞の役割. 第105回日本外科学会. 2005.
13. 武半優子, 熊井俊夫, 松本直樹, 鈴木登, 小林真一. ニコチンが関節リウマチ (RA) の病態形成に関与するソマトスタチン産生におよぼす影響. 第78回日本薬理学会. 2005.
14. 蒲地宏昌, 黒川真奈絵, 吉川英志, 渡辺憲史, 榊原学, 青木治人, 鈴木登. マウス胚性幹 (ES) 細胞より IGF II 遺伝子導入で分化誘導した筋系損傷モデルへの移植応用. 第4回再生医療学会総会. 2005.
15. 濱田真里, 吉川英志, 黒川真奈絵, 明石勝也, 青木治人, 鈴木登. マウス ES 細胞より Mash 遺伝子導入で分化誘導した Nogo/Nogo レセプター陰性神経細胞の損傷脊髄への移植応用. 第4回再生医療学会総会. 2005.
16. 井手路子, 黒川真奈絵, 池田律子, 吉川英志, 今井俊夫, 橋本卓雄, 鈴木登. マウス胚性幹細胞由来神経前駆細胞による損傷脳の移植治療および移植細胞の損傷部への遊走機構の解明. 第4回再生医療学会総会. 2005.
17. 阿藤晃一, 吉川英志, 黒川真奈絵, 熊谷憲夫, 鈴木登. マウス ES 細胞由来神経堤細胞 (neural crest cell) からのメラノサイトの分化誘導. 第4回再生医療学会総会. 2005.
18. 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.
19. 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. 大阪. 2006.
20. Kurokawa MS, 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.
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回日本脳神経外科学会総会. 2006.
22. Suzuki N. Involvement of Innate Immunity in the Pathogenesis of Intestinal Behcet's Disease. 12th International Conference on Behcet's disease. 2006.
23. 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・再生医学学会. 2006.
24. 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・再生医学学会. 2006.
25. 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・再生医学学会. 2006.
26. 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・再生医学学会. 2006.
27. 上野宏樹, 本間龍介, 嘉山真紀, 黒川真奈絵, 坪田一男, 上野聡樹, 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

- 学学会. 2006.
28. 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・再生医学学会. 2006.
 29. 丸山達哉, 奈良和彦, 鈴木登. Th1チロシンキナーゼ Txk の IFN γ 特異的調節機構の解明. 第27回日本炎症・再生医学学会. 2006.
 30. 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*. 2006.
 31. Ueno H, Kayama M, Homma R, Kurokawa MS, Yoshikawa H, Masuda C, Takada E, Tubota 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. 2006.
 32. Kayama M, Ueno H, Homma R, Kurokawa MS, 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. 2006.
 33. 奈良和彦, 黒川真奈絵, 金子栄, 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回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2006.
 34. 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回日本リウマチ学会総会・学術集会 2006.
 35. 嘉山真紀, 上野宏樹, 本間龍介, 黒川真奈絵, 上野聰樹, 鈴木登. pax-6遺伝子導入によるマウス胚性幹細胞の角膜上皮細胞への分化誘導. 第5回再生医療学会. 2006.
 36. 穴澤三恵, 蒲地宏昌, 黒川真奈絵, 吉川英志, 上田裕司, 増田知恵子, 高田えりか, 鈴木登. IGF II 遺伝子導入によりマウス胚性幹 ES 細胞から分化誘導された骨格筋細胞の解析. 第5回再生医療学会. 2006.
 37. 上野宏樹, 嘉山真紀, 本間龍介, 黒川真奈絵, 上野聰樹, 鈴木登. Pax6遺伝子導入胚性幹 (ES) 細胞より分化誘導した角膜上皮様細胞の角膜損傷モデルへの移植治療. 第5回再生医療学会. 2006.
 38. 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のよる脊髄損傷モデルの移植治療. 第5回再生医療学会. 2006.
 39. 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.
 40. 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.
 41. 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. 岡山 2006.
 42. 上野宏樹, 本間龍介, 上野聰樹, 嘉山真紀, 黒川真奈絵, 鈴木登. 眼発生遺伝子 (Pax6遺伝子) をマウス胚性幹細胞 (ES 細胞) に遺伝子導入後角膜上皮細胞への分化誘導と角膜移植への応用実験. 神奈川医学会 2006. 1
 43. Kurokawa MS, Suzuki N, Kato Tomohiro. ベーチェット病抹消血単核球における発現蛋白の網羅的検討. 第37日本免疫学会総会・学術集会. 2007.
 44. 奈良和彦, 黒川真奈絵, 松田隆秀, 鈴木登. 神経ベーチェット病における炎症性サイトカイン産生とその責任細胞の検討. 第37日本免疫学会総会・学術集会. 2007.
 45. 嘉山真紀, 黒川真奈絵, 上野宏樹, 熊谷悠太, 千葉俊明, 田所衛, 上野聰樹, 鈴木登. pax6遺伝子導入によるマウス胚性幹細胞の網膜神経節細胞への分化誘導. 第10回日本組織工学会. 2007.
 46. 上野宏樹, 黒川真奈絵, 嘉山真紀, 熊谷悠太,

- 本間龍介, 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特徴と角膜損傷モデルへの移植. 第10回日本組織工学会. 2007.
47. 熊谷悠太, 黒川真奈絵, 上野宏樹, 嘉山真紀, 坪田一男, 中辻憲夫, 仁藤新治, 上野聰樹, 鈴木登. 霊長類胚性幹細胞を用いた角膜上皮細胞の分化誘導と移植治療への応用. 第10回日本組織工学会. 2007.
48. 間淑郎, 黒川真奈絵, 奈良和彦, 千葉俊明, 池田律子, 仁藤新治, 中辻憲夫, 橋本卓雄, 鈴木登. 片麻痺モデルマウスにおける霊長類胚性幹 (ES) 細胞由来神経細胞移植の有用性. 第66回日本脳神経外科学会総会. 2007.
49. 嘉山真紀, 黒川真奈絵, 上野宏樹, 熊谷悠太, 千葉俊明, 田所衛, 上野聰樹, 鈴木登. Pax6遺伝子導入によるマウス胚性幹細胞の選択的網膜神経節前駆細胞への分化誘導. 第28回日本炎症・再生医学会. 2007.
50. 熊谷悠太, 黒川真奈絵, 上野宏樹, 嘉山真紀, 坪田一男, 中辻憲夫, 仁藤新治, 上野聰樹, 鈴木登. カニクイザル胚性幹細胞の角膜上皮細胞への分化誘導及び移植治療への応用実験. 第28回日本炎症・再生医学会. 2007.
51. 上野宏樹, 黒川真奈絵, 嘉山真紀, 熊谷悠太, 本間龍介, 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特性と角膜損傷モデルへの移植治療. 第28回日本炎症・再生医学会. 2007.
52. 間淑郎, 黒川真奈絵, 池田律子, 仁藤新治, 中辻憲夫, 近藤靖, 長田乾, 橋本卓雄, 鈴木登. カニクイザル ES 細胞からの運動神経分化誘導と脳損傷マウスへの移植応用. 第28回日本炎症・再生医学会. 東京 2007.
53. 黒川真奈絵, 鈴木登. マウス胚性幹細胞からの血管内皮細胞の誘導. 第28回日本炎症・再生医学会. 2007.
54. Suzuki N. Immune and inflammatory responses in Behcet's Disease. Japan Korea Joint Meeting on Behcet's Disease. Yokohama 2007.
55. 黒川真奈絵, 加藤智啓, 鈴木登. ベーチェット病患者末梢血単核球における発現蛋白の網羅的解析. 厚生労働科学研究 (難治性疾患克服研究事業) ベーチェット病に関する調査研究 平成19年度第1回研究班会議. 2007.
56. 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・維持に与える禁煙の影響. 第22回 平成18年度喫煙財団助成研究発表会. 2007.
57. Kayama M, Kurokawa MS, Ueda Y, Ueno H, Kumagai Y, Masuda C, Takada E, Ueno S, Tadokoro M, Suzuki N. Induction of Differentiation Into Retinal Ganglion Cells of Mouse Es Cells by Pax6 Gene Transfection. The Association for Research in vision and Ophthalmology 2007. 2007.
58. Kumagai Y, Kurokawa MS, Ueno H, Kayama M, Tsubota K, Nakatsuji N, Nito S, Ueno S, Suzuki N. Induction of Corneal Epithelium-Like Cells From Cynomorgus Monkey Embrionic Stem Cells and Their Experimental Transplantation to Damaged Cornea. The Association for Research in vision and Ophthalmology 2007. 2007.
59. Ueno H, Kurokawa MS, Kumagai Y, Kayama M, Homma R, Masuda C, Takada E, Tsubota K, Ueno S, Suzuki N. Characterization of Corneal Epithelium Like Cells Induced by Pax6 Gene Transfection of Mouse Embryonic Stem Cells. The Association for Research in vision and Ophthalmology 2007. 2007.
60. 黒川真奈絵, 松田隆秀, 鈴木登. 神経ベーチェット病の病態形成における炎症性サイトカインの役割. 第51回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2007.
61. 奈良和彦, 黒川真奈絵, 金子栄, 吉川英志, 松田隆秀, 鈴木登. ベーチェット病患者の病変局所におけるTLRを介したTh1優位の免疫応答. 第51回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2007.
62. 野中信宏, 黒川真奈絵, 池島秀明, 松田隆秀, 鈴木登. 神経ベーチェット病の病態形成における炎症性サイトカインの役割. 第104回日本内科学会総会・講演会. 2007.
63. 上野宏樹, 黒川真奈絵, 嘉山真紀, 熊谷悠太, 本間龍介, 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. 第6回日本再生医療学会総会. 2007.

64. 嘉山真紀, 黒川真奈絵, 上野宏樹, 熊谷悠太, 田所衛, 上野聰樹, 鈴木登. Pax6遺伝子導入によるマウス胚性幹細胞の網膜神経節前駆細胞への分化誘導. 第6回日本再生医療学会総会. 2007.
65. 熊谷悠太, 黒川真奈絵, 上野宏樹, 嘉山真紀, 本間龍介, 坪田一男, 上野聰樹, 鈴木登. カニクイザル胚性幹細胞からの角膜上皮細胞の分化誘導と移植治療への応用. 第6回日本再生医療学会総会. 2007.
66. 間淑郎, 黒川真奈絵, 池田律子, 仁藤新治, 中辻憲夫, 橋本卓雄, 鈴木登. カニクイザルES細胞からの運動神経分化誘導と脳損傷マウスへの移植応用. 第6回日本再生医療学会総会. 2007.
67. 黒川真奈絵, 鈴木登, 加藤智啓. ベーチェット病患者末梢血単核球における発現蛋白の網羅的検討. 厚生労働科学研究(難治性疾患克服研究事業)ベーチェット病に関する調査研究 平成19年度第2回研究班会議. 2007.
68. 奈良和彦, 黒川真奈絵, 鈴木登, 松田隆秀. 神経ベーチェット病における病態形成の検討. 厚生労働科学研究(難治性疾患克服研究事業)ベーチェット病に関する調査研究 平成19年度第2回研究班会議. 2007.

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

ベーチェット病における血清 S100A8/A9 蛋白についての研究

分担研究者 岩月 啓氏 (岡山大学大学院医歯学研究科皮膚・粘膜・結合織学 教授)
共同研究者 山崎 修 (岡山大学大学院医歯学研究科皮膚・粘膜・結合織学)
青地 聖子 (岡山大学大学院医歯学研究科皮膚・粘膜・結合織学)
辻 和英 (岡山大学大学院医歯学研究科皮膚・粘膜・結合織学)

研究要旨

S100A8/A9はCa結合性蛋白で、主に、表皮ケラチノサイト、好中球、単球から分泌される proinflammatory mediator である。ベーチェット病における炎症反応を反映するマーカーとしての意義を検討するために、血清 S100A8/A9濃度を測定し、活動性との相関について検討した。さらに、BD113-20株由来の菌体抗原や HSP 由来の合成ペプチドを用いて、ヒト単球系細胞株を刺激し、培養上清から S100A8/A9濃度を測定した。その結果、血清中 S100A8/A9濃度は活動性ベーチェット病で有意に上昇し、CRP 値と相関していた。HSP 由来の合成ペプチドを用いて、ヒト単球系細胞株を刺激した培養上清からの S100A8/A9濃度は低値であった。S100A8/A9は好中球性炎症反応を反映し、ベーチェット病の病勢と関連していると考えられる。

A. 研究目的

ベーチェット病の病変部に浸潤する細胞は主に好中球であるが、多数のリンパ球の浸潤も認める。これまでの研究で、granzymeB や granulysin などを有する細胞傷害性T細胞がアフタ、外陰部潰瘍、毛包炎では多数浸潤していた。今回、関節症や発熱などの全身性炎症のメディエーターとして S100A8/A9の臨床的意義について研究を解析する。

B. 研究方法

1. 岡山大学病院, 岡山大学関連病院, 福島医科大学附属病院皮膚科通院中の BD 患者 (n=46) の血清より ELISA 法により S100A8/9 蛋白 (calprotectin) 濃度を測定した。掌蹠膿疱症 (n=8), 健常人 (n=8) と比較した。また、活動期 BD (n=30) と非活動期 BD (n=16) に分けて比較検討した。活動期分類については厚生労働省の研究班により改定 (2003年) された分類に準じた。
2. CRP や臨床症状と S100A8/9 蛋白濃度との相関を検討した。
3. 1 症例において経時的に S100A8/9 蛋白濃度を測定し、臨床経過と推移との関係をみた。
4. BD113-20株由来の菌体抗原や HSP 由来の合

成ペプチドを用いて、ヒト単球系細胞株である U937, NOMO-1 株を刺激し、培養上清から S100A8/9 濃度を測定した。

5. S100A8, A9の皮膚粘膜病変部での免疫染色を検討した。

(倫理面への配慮)

プールされた血清および、インフォームドコンセントを得たうえで、一般検査検体の残りをご提供頂いた。

C. 研究結果

1. 血清 S100A8/9 蛋白濃度は活動期 BD で非活動期、掌蹠膿疱症、健常人と比べ有意に上昇していた (図1)。
2. 血清 S100A8/9 蛋白濃度高値例 (1000ng/mL 以上) の臨床症状は口腔内アフタ (9/13例)、外陰部潰瘍 (5/13例)、眼症状 (1/13例)、結節性紅斑 (2/13例)、ざ瘡 (5/13例)、血栓性静脈炎 (3/13例)、発熱 (5/13例)、関節炎 (0/13例) であった (図2)。

CRP と血清 S100A8/9 蛋白濃度は全検体 (BD, 掌蹠膿疱症, 健常人を含む) でみると統計学的には CRP と相関していた (図3)。

3. 経時的に血清濃度を測定した症例を提示す

る。症例は初診の1年前より微熱を伴って下腿に発赤・腫脹を繰り返し、その後視力低下を自覚、口腔内アフタ、ざ瘡出現し、当科入院した。安静と種々の治療で徐々に症状の改善と CRP の減少が認められたが、S100A8/9 濃度は CRP とは少し遅れて減少した（図4）。

4. 単球からの産生：ヒト単球系細胞株では、PMA や HSP 刺激を加えても U937 からの S100A8 のはベースラインから上昇せず、NOMO1 では軽度の産生がみられるのみであった（図5, 6）。
5. 外陰部潰瘍、口腔内アフタでは好中球、単球に発現していた。毛包炎では好中球に、結節性紅斑部では少数ではあるが単球に発現していた（図7）。

D. 考 察

ベーチェット病発症には、細胞傷害性 T リンパ球、単球、好中球がエフェクター細胞として注目されている。これまで、われわれは皮膚および粘膜病変部（口内アフタ、外陰部潰瘍、毛包炎）において細胞傷害性 T 細胞浸潤が強いが、結節性紅斑部ではこれらの細胞傷害性 T 細胞浸潤が少ないことを報告した。

ベーチェット病の結節性紅斑部では多数の好中球浸潤を特徴とすることから、好中球性炎症を反映するバイオマーカーとして S100A8/A9 に注目して検討を加えた。その結果、活動性が高い症例では、血清 S100A8/A9 の高値が明らかで、血清 CRP とも相関することがわかった。

S100A8/A9 は RAGE などの受容体を介してターゲット細胞にアポトーシスを誘導したり、逆に活性化して炎症性サイトカインを放出させる proinflammatory mediator と考えられている。したがって、S100A8/A9 高値は単なる炎症のマーカーではなく、全身性炎症反応を惹起する分子としての臨床的意義がある。

S100A8/A9 産生経路を制御することは全身性炎症を抑えることにつながると思われる。

E. 結 論

血清中 S100A8/A9 濃度は活動性ベーチェット病で有意に上昇し、CRP 値と相関していた。HSP 由来の合成ペプチドを用いて、ヒト単球系細胞株

を刺激した培養上清からの S100A8/A9 濃度は低値であった。S100A8/A9 は好中球性炎症反応を反映し、ベーチェット病の病勢と関連していると推測した。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hamada T, Matsuura H, Oono T, Yamasaki O, Asagoe K, Yamamoto T, Tsuji K, Iwatsuki K. Karyotypic analysis of marrow cells in pyodermic lesions associated with myelodysplastic syndrome. *Arch Dermatol*, in press.
- 2) Aochi S, Nakanishi G, Suzuki N, Setsu N, Suzuki D, Aya K, Iwatsuki K. A novel homozygous mutation of the EVER1/TMC6 gene in a Japanese patient with epidermodysplasia verruciformis. *Br J Dermatol* 2007, Epub ahead of print.
- 3) Yamasaki O, Asagoe K, Otuka M, Oono T, Iwatsuki K. Infectious complications and managements for surgical site infections in genital Paget's disease. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2007; 21: 897-901
- 4) Yamamoto T, Tsuji K, Suzuki D, Morizane S, Iwatsuki K. A novel, noninvasive diagnostic probe for hydroa vacciniforme and related disorders: Detection of latency-associated Epstein-Barr virus transcripts in the crusts. *J Microbiol Methods*, 2007, 68: 403-407
10. Yamada A, Yamasaki O, Asagoe K, Tsuji K, Hamada T, Ota Y, Iwatsuki K. Recovery from Sezary syndrome following *Mycobacterium avium* spondylitis. *Br J Dermatol* 2007, Epub ahead of print.
11. Sugiyama H, Asagoe K, Morizane S, Oono T, Okazaki F, Iwatsuki K. Leukocyte common antigen-negative, aggressive cutaneous anaplastic large cell lymphoma with prominent pseudocarcinomatous hyperplasia. *Eur J Dermatol*, in press.

2. 学会発表

- 1) 岩月啓氏, 山崎修, 森実真: Behcet 病の皮膚・