

図3. NK細胞パスウェイのコンポーネント

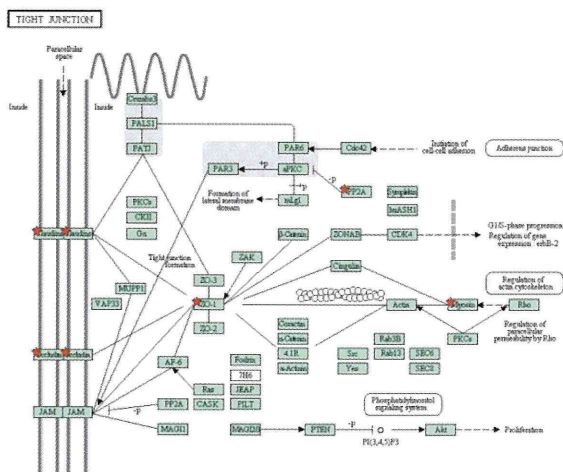


図4.タイトジャンクションのコンポーネント

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

ベーチェット病動物モデルの免疫異常解析と制御法の開発に関する研究  
— 新規NKT細胞リガンドを用いた実験的自己免疫性網膜ぶどう膜炎（EAU）の  
予防実験 —

研究分担者	岩淵和也	北里大学医学部免疫学
研究協力者	佐藤 雅	北里大学医学部免疫学
	南場研一	北大院医眼科学分野
	石田 晋	北大院医眼科学分野
	北市伸義	北海道医療大個体差医療科学センター
	大野重昭	北大院医炎症眼科学講座
	谷口 克	理研免疫アレルギー科学総合研究センター

研究要旨

我々は以前の報告でNKT細胞欠損マウス（J 18<sup>-/-</sup>, CD1d<sup>-/-</sup>）ではEAUの臨床スコアがむしろ重症化することを示した。したがって、野生型マウスではNKT細胞が何らかのメカニズムでEAUの病態進展を抑制している可能性があると考えられた。しかし、野生型マウスで、 $\alpha$ -galactosylceramideなどの通常型 type I NKT細胞リガンド投与によるNKT細胞活性化は、EAUを軽症化することには無効であった。今回、理化学研究所からの提供されたIFN- $\gamma$ 誘導能の高い新規NKT細胞リガンド（RCAI-56）をEAU誘導と同時に投与した場合、抗原感作時（予防的投与）に1回2g/匹のRCAI-56の投与により、病理組織学スコアが有意に低下することを見出した。すなわち、新規リガンドによる選択的NKT細胞活性化により、EAUの発症・進展を予防することが出来た。

A. 研究目的

NKT細胞はCD1d拘束性に糖脂質抗原を認識する自然T細胞の1亜群であり、さらにはT細胞受容体とその認識抗原によってtype I (V 14J 18<sup>+</sup>;  $\alpha$ -GalCer)・type II (diverse TCR<sup>+</sup>; 多様な糖脂質・リン脂質) のサブセットに分けられる<sup>1</sup>。NKT細胞は自身がエフェクターとなる他、免疫制御能も発揮し得る。眼炎症に対しても何らかの抑制的機能を有している可能性が期待され、実際にNKT細胞は前房関連免疫偏倚（ACAID）成立に重要な役割を果たしていることを、園田らが報告

している<sup>2</sup>。

そこで、(EAU)におけるNKT細胞の役割を明らかにする目的で、NKT欠損マウス（CD1d<sup>-/-</sup>・J 18<sup>-/-</sup>）とC57BL/6 (B6;野生型)にEAUを誘導し、発症・進展過程を比較した。また、野生型マウスにEAUを誘導し、 $\alpha$ -GalCerあるいはOCH（type I NKT細胞リガンド）でNKT細胞を活性化した場合の発症・進展過程を比較した。その結果、NKT細胞欠損マウスでは、EAUは重症化したが、野生型マウスでNKT細胞をいずれのリガンドで活性化しても、EAUは軽症化しなかつ

た。また実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の系で、軽症化が報告されたtype II NKT細胞リガンドであるスルファチド3の投与では、逆に臨床スコアの重症化が誘導された。

近年、多くの新規NKT細胞リガンド (特にtype Iリガンド) が合成され、それぞれに免疫偏倚などに特徴を有し、様々な用途が考えられている<sup>4</sup>。今回、理化学研究所で新しく開発された新規リガンドであるRCAI-56 (-carba-GalCer)<sup>5</sup>を用い、これまでとは異なる結果が得られたので報告し、奏功メカニズムについて考察する。

## B. 研究方法

1. EAUの誘導と評価法：6週齢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(hIRBP<sub>1-20</sub>:GPTHLFQPSLVLDMAKVLLD) 200 gを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 gを腹腔内投与することによって誘導した<sup>6</sup>。3週間後、眼球はグルタルアルデヒド前固定/フォルマリン後固定後、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。
2. RCAI-56の投与：RCAI-56は2 g/匹を、対照群はvehicleのみ同量を、IRBP/CFA乳剤と混合して、皮下に投与した。
3. 倫理面への配慮  
動物実験は北里大学動物実験委員会で審議を経たのち、許可を得てから実施した (#2011-106)。

## C. 研究結果

21日目のRCAI-56投与群の組織病理スコアは $0.32 \pm 0.80$  (n=14), vehicle投与群 $2.2 \pm 1.57$  (n=10)と投与群で有意に低下していた (図1 ; p = 0.0007)。-GalCerやOCHなどの代表的なtype I NKT細胞リガンドの投与

では得られなかった軽症化がRCAI-56により確認された。

## D. 考察

NKT細胞欠損マウスでEAUの臨床スコアが高く、重症化するという結果は、ぶどう膜炎においてNKT細胞が何らかの抑制的役割を果たしていることを示唆する。しかしながら、既存のtype I NKT細胞リガンドである $\alpha$ -GalCer、OCHなどでNKT細胞を活性化してもEAUは軽症化しなかった。Caspiらも同様の報告をしているが<sup>7</sup>、そこで $\alpha$ -GalCerの投与で軽症化が誘導されていた。EAUの病態進展にTh17が関与すると考えると、この抑制にIFN- $\gamma$ を強く誘導するリガンドが逆説的ではあるが、奏功する可能性がある。そこで、我々も理研で新たに開発されたTh1免疫偏倚リガンドである $\alpha$ -carba-GalCer (RCAI-56)を感作時に投与し、病理組織学的スコアを解析すると確かに軽症化が誘導された。今後はRCAI-56でもIL-17産生の低下や、抗原特異的増殖反応の抑制があるか否かを比較し、奏功メカニズムを明らかにするとともに、発症後の投与 (治療的投与) でも効果が認められるか検討する予定である。

## E. 結論

新規NKT細胞リガンドRCAI-56は、ぶどう膜炎発症を予防する可能性が示された。

## References:

1. Van Kaer L. Curr Opin Immunol 19: 354-364, 2007.
2. Sonoda K-H, et al. J Exp Med. 190, 1215-26, 1999.
3. Jahng AW, et al. J Exp Med. 194, 1789-99, 2001.
4. Pauwels N, et al. Org Biomol Chem 2011; 9: 8413-21.

5. Tashiro T, et al. *Int Immunol* 2010; 22: 319-28.
6. Tarrant TK et al. *J Immunol* 1998; 161: 122-7.
7. Gajewski RS, et al. *J Immunol* 2008; 181: 4791-7.

F. 健康危険情報  
特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hirata N, Ogura H, Satoh M, Noguchi M, Matsumoto M, Togashi H, Onoe K, Iwabuchi K. The role of tumor necrosis factor- $\alpha$  for interleukin-10 production by murine dendritic cells. *Cell Immunol* 2011; 266 (2): 165-71.
2. Kurotaki D, Kon S, Bae K, Ito K, Matsui Y, Nakayama Y, Kanayama M, Kimura C, Narita Y, Nishimura T, Iwabuchi K, Mack M, van Rooijen N, Sakaguchi S, Uede T, Morimoto J. CSF-1-dependent red pulp macrophages regulate CD4 T cell responses. *J Immunol* 2011; 186 (4): 2229-2237.
3. 岩渕和也：NKT細胞の分化と機能. *北里医学* 2011; 41(2): 99-109.
4. Tamauchi H, Amoh Y, Ito M, Terashima M, Masuzawa M, Habu S, Katsuoka K, Iwabuchi K. GATA-3 regulates contact hyperresponsiveness in a murine model of allergic dermatitis. *Immunobiol* (in press)
5. Satoh M, Andoh Y, Clingan CS, Ogura H, Fujii S, Eshima K, Nakayama T, Taniguchi M, Hirata N, Ishimori N, Tsutsui H, Onoe K, Iwabuchi K.

Type II NKT cells stimulate diet-induced obesity by mediating adipose tissue inflammation, steatohepatitis and insulin resistance. *PLoS ONE* (in press)

2. 学会発表

1. Satoh M, Eshima K, Fujii S, Nakayama T, Taniguchi M, Ishimori N, Iwabuchi K. Type II NKT cells operate diet-induced obesity by mediating adipose tissue inflammation and steatohepatitis. 第40回日本免疫学会学術集会2011. 11. 27 (Chiba)
2. Satoh M, Andoh Y, Clingan CS, Ogura H, Fujii S, Nakayama T, Taniguchi M, Ishimori N, Tsutsui H, Van Kaer L, Ono? K, Iwabuchi K. Type II NKT cells operate diet-induced obesity by mediating adipose tissue inflammation, steatohepatitis and insulin resistance. The 6th Intl. Symposium on CD1/NKT cells 2011. 9. 23 (Chicago, USA)

H. 知的財産権の出願、登録状況  
なし

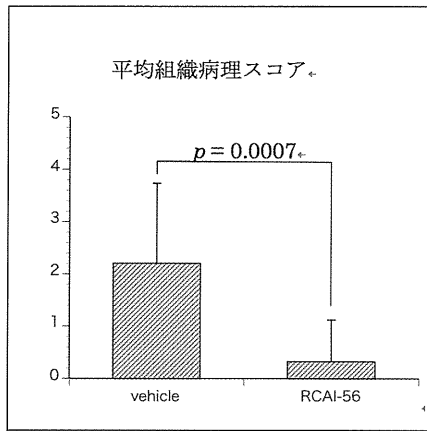


図1. 新規NKT細胞リガンド投与によるぶどう膜炎の組織病理スコアの軽症化  
対照群 (vehicle) に比べ, RCAI-56を抗原感作時に投与した実験群では, 感作後21日目の眼球組織病理スコアが有意に低下していた ( $p = 0.0007$ ).

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CD4T細胞におけるIL-17およびIFN $\gamma$ の共発現」

研究分担者 鈴木 登 聖マリアンナ医科大学 免疫学・病害動物学教室  
清水 潤 聖マリアンナ医科大学 免疫学・病害動物学教室  
金子史男 福島県立医科大学 皮膚科学教室  
金子 栄 島根県立病院 皮膚科

研究要旨

ベーチェット病（BD）におけるTh1とTh17の関連について検討した。その結果、BD末梢血メモリーCD4+T細胞において、IFN- $\gamma$ とIL-17を共産生細胞の割合が健常人に比し有意に増加しており、逆にIFN- $\gamma$ 単独産生細胞の割合は有意に減少していた。末梢血ナイーブCD4+T細胞の刺激・培養試験では、Th1刺激にてIFN- $\gamma$ およびRORC、Th17刺激にてIL-17、IL-23RおよびRORCのmRNAが、BDにおいて健常人に比し有為な発現亢進が見られた。これらのことはBDの病因にIFN- $\gamma$ 、IL-17共発現メモリーCD4+T細胞が関与し、同細胞の惹起にはIL-23によるオートクライン/パラクラインの刺激が関係している可能性を示唆する。

A. 研究目的

これまでにわれわれはベーチェット病（BD）の末梢血および皮膚病変部で、Th1に加えTh17に関しても異常があり、病態形成に関与している可能性を報告した。

そこで本年度はベーチェット病における、Th1とTh17の関連を同様に末梢血と皮膚病変部で検討した。

B. 研究方法

①末梢血メモリーCD4+T細胞のサイトカイン産生能

対象は活動性のあるBD患者n=8、健常人n=16。末梢血よりフィコール法により単核細胞（PBMC）を分離、磁気ビーズでセントラルおよびイフェクターメモリーCD4+T細胞を分離。分離後直ちに、IFN- $\gamma$ およびIL-17の細胞内染色を行い、フローサイトメーターで観察。

②刺激後末梢血ナイーブCD4+T細胞の遺伝子発現

対象は活動性のあるBD患者n=7、健常人n=7。①と同様の方法で、ナイーブCD4+T細胞を分離。Th0、Th1、Th2、Th17環境下で1週間刺激・培養したのちにmRNAを抽出し、real time PCR法を用いて半定量的解析し、BDを健常者と比較。前年度報告の結果を受け以下のmRNAを測定。IFN- $\gamma$ 、IL-17、IL-23レセプター、RORC、Smad2。

（倫理面への配慮）

本研究は、ヘルシンキ宣言（2008年ソウルWMA総会にて修正）の精神に基づいて実施する。実施にあたっては横浜市立大学の規約に基づいて倫理委員会での承認を得た上で実施する。

C. 研究結果

①末梢血メモリーCD4+T細胞のサイトカイン産生能

BDのメモリーCD4+T細胞では、セントラル、イフェクターともに健常者に比較し、IFN- $\gamma$ およびIL-17を共産生する細胞の割合が有意に高値であった(p<0.01)。逆に、IFN- $\gamma$ 単独産生細胞は有意に低値であった(p<0.01)。

②刺激後末梢血ナイーブCD4+T細胞の遺伝子発現

Th1刺激にてIFN- $\gamma$ およびRORC、Th17刺激にてIL-17、IL-23RおよびRORCのmRNAが、BDにおいて健常人に比し有為な発現亢進が見られた。

#### D. 考察

BDのCD4+T細胞分化においては、ナイーブの段階で何らかの誘因によって、IL-23に対する感受性が高くなり、このことが病原性を持つと考えられる IFN- $\gamma$ とIL-17をともに産生する細胞の、発生・維持に関連するものと考察する。

#### E. 結論

BDではIFN- $\gamma$ とIL-17を共産生する細胞が高頻度で存在し、病原性に関与している可能性がある。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Shimizu J, Takai K, Fujiwara N, Arimitsu N, Ueda Y, Wakisaka S, Yoshikawa H, Kaneko F, Suzuki T, Suzuki N. Excessive CD4+ T cells co-expressing IL-17 and IFN  $\gamma$  in

patients with Behcet's disease. Clin Exp Immunol 2012 In press.

2. Shimizu J, Fujiwara N, Arimitsu N, Ueda Y, Wakisaka S, Yoshikawa H, Kaneko F, Suzuki T, Takai K, Suzuki N. Skewed TGF  $\beta$  /Smad signaling pathway in T cells in patients with Behcet's disease. Clin Exp Rheum Submitted.

##### 2. 学会発表

1. 清水 潤、鈴木 登 ベーチェット病におけるCD4T細胞分化異常 第55回日本リウマチ学会総会・学術集会

#### 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

特記事項なし。

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

Th17およびTh1/Th17サブセットの両方がベーチェット病の病態に関与している

研究分担者 桑名 正隆 慶應義塾大学医学部内科学教室  
研究協力者 安岡 秀剛 慶應義塾大学医学部内科学教室  
竹内 勤 慶應義塾大学医学部内科学教室

研究要旨

目的：これまで我々はベーチェット病(BD)の病態におけるTh17の関与を検討してきた。この中で末梢血CD4+ T細胞から誘導されたIL-17産生細胞の大半がケモカインレセプターCCR6を発現していたことからこの細胞群の病態への関与について検討してきた。Th17のサブセットはケモカインレセプターの発現パターンで規定されることから、今回はTh17のサブセットの病態への関与について追究し、これらの浸潤がどのケモカインによって規定されるか検討した。

方法：対象はBD13例（活動期6例、非活動期7例）、健常人4例。CD4+ T細胞中におけるこれまで報告されているTh17のサブセット（CCR6+CCR4+ 細胞：IL-17のみを産生（Th17サブセット）、CCR6+CXCR3+ 細胞：IL-17とIFN- $\gamma$ を産生（Th1/Th17サブセット）およびCCR2+CCR5- 細胞：IL-17を産生する別のサブセット）の比率をフローサイトメトリーで検討した。さらにBD 27例、健常人 13例でTh17のサブセットに発現するケモカインレセプターに対応するケモカイン（CCL20, RANTES, CXCL9, MCP-1）の循環血中の濃度を酵素免疫測定法をもちいて測定した。

結果：健常人と比較し、BDではTotal Th17、Th17サブセットの比率が上昇していた。活動期BDでは非活動期BDと比較し、CD4+ T細胞中のCCR6+細胞、Th17サブセット、Th1/Th17サブセットの比率が有意に減少していた。CCR2+CCR5-細胞の比率は変化がなかった。またケモカインでは、血漿中CCL20濃度のみがBDで健常人と比較し有意に上昇していた。

【今後の見込み】

以上より、BDではTh17およびTh1/Th17の両サブセットがCCL20-CCR6 axisを介して病態に関与する可能性が示された。

A. 研究目的

ベーチェット病(BD)は原因不明の炎症性疾患であり、病変部組織ではリンパ球の浸潤が認められる。これまで、BDではCD4+ T細胞応答がTh1に偏位することが示されてきた。近年、CD4+T細胞にはTh1/Th2サブセット以外にIL-17産生を特徴とするTh17の存在

が報告された。また、最近の全ゲノム相関解析でTh17分化に必要なIL-23レセプターをコードするIL-23RB2遺伝子がBDの疾患感受性遺伝子の一つとして同定され、BDの病態へのTh17の関連が想定されている(1, 2)。これまで我々はTh17がBD病態形成に関連する可能性を追究し、これまでTh17の前駆細胞を含



むCD4+CCR6+細胞がCCL20-CCR6 axisを介して病変形成に関与する可能性を示してきた。Th17はケモカインレセプターの発現よりサブセットに分けられることから(3-5)。本年度はBD病態におけるTh17サブセットの病態への関与を検討した。

## B. 研究方法

### 1. 対象

対象は厚生労働省BD診断基準を満たすBD 13例および健常人4例を対照として用いた。その臨床特徴を表1に示す。また血漿を用いた検討ではBD27例、健常人13例を用いた。ステロイドおよび免疫抑制薬の追加・増量を要する臓器病変・症状の増悪を伴っていた症例を活動期、治療の変更を必要としなかった症例を非活動期と分類した。

### 2. Th17サブセットの検出

CD4+CCR6+ 細胞群をTotal Th17細胞群と定義し(3, 4)、ケモカインレセプター発現の組み合わせによりCD4+CCR6+CCR4+細胞群をIL-17産生IFN- $\gamma$ 非産生細胞(Th17サブセット)、CD4+CCR6+CXCR3+細胞群をIL-17産生IFN- $\gamma$ 産生細胞(Th1/Th17サブセット)と定義した(4)。また他のグループにより別のTotal Th17細胞群として報告されているCCR2+CCR5-細胞群についても検討した(5)。患者および健常人よりヘパリン添加で採取した末梢血から比重遠心法により末梢血単核球および血漿を分離した。過去の報告に基づきCD4およびCCR2、CCR4、CCR5、CCR6、CXCR3の発現はそれぞれの分子に対する蛍光標識抗体と末梢血単核球を反応させた後、FACSCalibur (Becton Dickinson)を用いたフローサイトメトリーにより解析した。各細胞群の比率はCD4+細胞中の比率として算出した。

### 3. 血漿中のTh17サブセット関連ケモカインの検出

上記で分離した血漿を用い、Th17サブセットを規定するケモカインレセプターに対応するケモカイン(MCP-1、RANTES、CCL20、CXCL9、CCL20)をenzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)(Quantikine, R&D)で検出した。

### 4. 統計学的解析

2群間の比較はMann-Whitney U-testで検討し、 $P<0.05$ を有意とした。

(倫理面への配慮)

すべての症例で本研究に関する説明を行い、文書によるインフォームドコンセントを取得した。

## C. 研究結果

表2に示すように、Total Th17(CD4+CCR6+ T細胞群)のCD4+細胞中の比率は、健常人と比較し、非活動期BD患者で高値、活動期でも高い傾向があった。活動期と非活動期で比較すると非活動期で高値であった。Th17サブセット、Th1/Th17サブセットの比率はともにTotal Th17細胞群と同様、健常人と比較し、非活動期BD患者で高値、活動期でも高い傾向があり、非活動期で比較すると非活動期で高値であった。また過去にTotal Th17群として報告されているもう一つの細胞群(CCR2+CCR5-細胞群)の比率は、健常人、活動期、非活動期のそれぞれの2群間で差を認めなかった。

BDの病態の中でいずれのケモカイン/ケモカインレセプターがこれらのサブセットの遊走に関わっているか検討するために、Th17のサブセットを規定しているケモカインレセ

プターに対応したケモカインの血漿中の濃度を測定した。それぞれCCR2に対応するMCP-1、CCR4・CCR5に対応するRANTES、CCR6に対応するCCL20、CXCR3に対応するCXCL9についてELISAで測定し、健常人と比較した。BDでは血漿CCL20濃度が有意に高値であった（図1）が、その他のケモカインでは差を認めなかった。CCL20濃度は活動期および非活動期で比較すると有意な差は認めなかったが、CCL20濃度が100 pg/mlを越えて高値であった3例の臨床的特徴を検討すると、全例が完全型で、1例は眼病変活動期、2例は非活動期で、1例はステロイドおよびシクロスポリン内服、1例はコルヒチンおよびステロイド点眼で加療されるも眼病変の消褪が認められない症例であった。

#### D. 考察

本年度はBD末梢血中におけるTh17サブセットについて検討した。その結果、IL-17産生IFN- $\gamma$ 非産生のTh17サブセットおよび両方を産生するTh1/Th17サブセットの両方の比率が、非活動期と比較し活動期で低値であったことから、BD病変部にはTh17サブセットおよびTh1/Th17サブセットの両方が浸潤し、病変形成に関与している可能性が考えられた。さらにそれぞれのサブセットを規定しているケモカインレセプターに対応したケモカイン濃度について検討した結果、健常人と比較し、CCL20濃度のみがBDで高値であった。過去にBD病変部皮膚組織でCCR6+細胞が増加していたことを合わせると、これらの結果よりTh17およびそのサブセットがCCR6-CCL20 axisを介して末梢にリクルートし、病変形成に関与している可能性が考えられた。

今回の結果からはTh1/Th17およびTh17サブセットの両方が病変部に浸潤している可能性が考えられた。最近の知見によるとTh17

はTh1やTh2に分化する前段階の一時的なフェノタイプとして考える説がある。今回得られた結果は、Th17からTh1/Th17を経て、Th1へと変化していく過程すなわちTh1へのシフトを指向したBDの免疫学的環境を反映しているのかもしれない。

IL-17産生はマイトゲン刺激なしに末梢血中のCD4+ T細胞で検出することはきわめて難しく、また一方でよい細胞表面マーカーがないことから末梢血を用いてTh17前駆細胞を直接検出することも難しい。我々はこれまで過去の報告に基づきCD4+CCR6+細胞に着目して検討してきた。しかし、CD4+CCR6+細胞群はTh17以外の細胞を含んでおり、これらが病態と関連する可能性は否定できない。またTh17に関連する一連の所見がベーチェット病特異的な現象かどうかという点、またTh17 signatureに含まれるIL-17以外のサイトカインと病態との関連などまだ未知な部分がある。今後も検討の必要性があると考えられた。

#### E. 結論

BDではTh17サブセットおよびTh1/Th17サブセットの比率が活動性ととも低下し、両方の細胞群が病変部に浸潤している可能性が考えられ、CCR6-CCL20 axisを介している可能性が示唆された。これら細胞群が病態において重要や役割を持つ可能性があるかもしれない。

#### (文献)

- 1) Mizuki N, Meguro A, Ota M, Ohno S, Shiota T, Kawagoe T, Ito N, Kera J, Okada E, Yatsu K, Song YW, Lee EB, Kitaichi N, Namba K, Horie Y, Takeno M, Sugita S, Mochizuki M, Bahram S, Ishigatsubo Y, Inoko H.

- Genome-wide association studies identify IL23R-IL12RB2 and IL10 as Behcet's disease susceptibility loci. *Nat Genet.* 2010;42(8): 703-6.
- 2) Remmers EF, Cosan F, Kirino Y, Ombrello MJ, Abaci N, Satorius C, Le JM, Yang B, Korman BD, Cakiris A, Aglar O, Emrence Z, Azakli H, Ustek D, Tugal-Tutkun I, Akman-Demir G, Chen W, Amos CI, Dizon MB, Kose AA, Azizlerli G, Erer B, Brand OK, Kaklamani VG, Kaklamani P, Ben-Chetrit E, Stanford M, Fortune F, Ghabra M, Ollier WE, Cho YH, Bang D, O'Shea J, Wallace GR, Gadina M, Kastner DL, Gul A. Genome-wide association study identifies variants in the MHC class I, IL10, and IL23R-IL12RB2 regions associated with Behcet's disease. *Nat Genet.* 2010; 42(8): 698-702.
- 3) Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Interleukin 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol.* 2007;8(9):942-9.
- 4) Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A, Sallusto F, Napolitani G. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol.* 2007; 8(6): 639-646.
- 5) Sato W, Aranami T, Yamamura T. Cutting edge: Human Th17 cells are identified as bearing CCR2+CCR5- phenotype. *J Immunol.* 2007;178(12): 7525-7529.
- F. 健康危険情報  
特記事項なし。
- G. 研究発表  
論文発表
- Hirohata S, Kikuchi H, Sawada T, Nagafuchi H, Kuwana M, Takeno M, and Ishigatsubo Y. Clinical characteristics of neuro-Behcet's disease in Japan: a multicenter retrospective analysis. *Mod. Rheumatol.* In press.
  - 桑名正隆: 診断・治療の進歩; Behçet病. *内科* 107(4): 603-606, 2011.
  - 山口由衣、桑名正隆: Behçet病; Behçet病の病態とNK細胞. *炎症と免疫* 19(5): 491-494, 2011.
- 学会発表
- Yasuoka H, Chen Z, Takeuchi T, Kuwana M: Th17 is involved in the pathogenesis of Bechet's disease. The 98th Annual Meeting of American Association of Immunology (San Francisco). 2011. 5.
  - 広畑俊成、菊池弘敏、沢田哲治、永渕裕子、桑名正隆、岳野光洋、石ヶ坪良明: 多施設後ろ向きコホート調査に基づく急性型神経および慢性進行型神経ベーチェット病の診断基準の作成. 第52回日本神経学会学術大会 (名古屋). 2011. 5.
  - Yamaguchi Y, Takahashi H, Satoh T, Okazaki Y, Mizuki N, Takahashi K, Ikezawa Z, Kuwana M: The role of natural killer cells in patients with Behcet disease. *World Congress of*

Dermatology 2011 in Korea (Seoul).  
2011. 5.

4. 安岡秀剛、竹内勤、桑名正隆: ベーチェット病 (BD) の病態とTh17の関連について. 第55回日本リウマチ学会総会 (東京). 2011. 7. (ワークショップ: ベーチェット病)

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  
なし

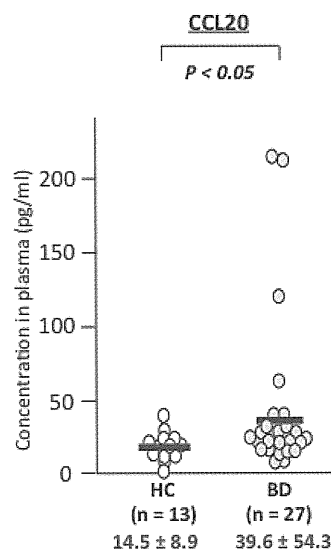


図1. 健常人(HC)およびベーチェット病患者 (BD)における血漿CCL20濃度.

表1. Th17サブセットを検討したBD患者の臨床特徴

活動期 : 非活動期	6 : 7
男性 : 女性	6 : 7
採血時年齢 (年) (平均 ± SD)	40.6 ± 12.5
HLA-B51(+)	10/13 (77 %)
眼病変	13/13 (100 %)
特殊病型 神経	5/13 (39 %)
血管	1/13 (8 %)
腸管	1/13 (8 %)
治療 ステロイド内服	5/13 (38 %)
ステロイド点眼	9/13 (69 %)
コルヒチン内服	7/13 (54 %)
シクロスポリン内服	3/13 (23 %)

表2. 健常人(HC)および活動期ベーチェット病患者(BD)、非活動期BDにおけるTotal Th 17・各Th17サブセットの比率

	健常人	活動期BD	非活動期BD
Total Th17 細胞 (%)	2.1 + 3.3	8.1 + 6.0*	41.0 + 17.2**
Th17 サブセット (%)	1.9 + 3.4	7.6 + 5.7*	38.7 + 14.8**
Th1/Th17 サブセット (%)	1.2 + 2.1	2.1 + 2.8	9.2 + 6.3 **
CCR2*CCR5 サブセット (%)	1.2 + 0.9	2.4 + 2.3	1.9 + 1.0

\* 健常人と比較し P < 0.05  
\*\* 活動期BDと比較し P < 0.05

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

ベーチェット病感受性遺伝子多型と病型、病態、治療効果の検討

分担研究者 水木信久 横浜市立大学医学部眼科学教室  
研究協力者 目黒 明<sup>1)</sup> 太田正穂<sup>2)</sup> 大野重昭<sup>3)</sup> 河越龍方<sup>1)</sup>  
南場研一<sup>4)</sup> 北市伸義<sup>5)</sup> 岳野光洋<sup>6)</sup> 石ヶ坪良明<sup>6)</sup>  
杉田 直<sup>7)</sup> 望月 學<sup>7)</sup> 猪子英俊<sup>8)</sup>

- 1) 横浜市立大学医学部眼科学 2) 信州大学医学部法医学  
3) 北海道大学大学院医学研究科炎症眼科学 4) 北海道大学大学院医学研究科視覚器病学  
5) 北海道医療大学個別差医療科学センター眼科 6) 横浜市立大学医学部病態免疫制御内科学  
7) 東京医科歯科大学医学部眼科学 8) 東海大学医学部分子生命科学

研究要旨

我々はゲノム全域をカバーする遺伝的多型を用いたベーチェット病のゲノムワイドな相関解析（Genome-wide association study：GWAS）を完了している。マイクロサテライト多型を用いたGWASでは、HLA-B\*51に次ぐベーチェット病の第2の疾患感受性遺伝子としてHLA-A\*26を同定した。SNPを用いたGWASでは、新たな疾患感受性遺伝子としてIL10およびIL23R-IL12RB2を見出した。

本研究では、HLA-B\*51、HLA-A\*26、IL10およびIL23R-IL12RBの遺伝因子がベーチェット病の臨床像に与える影響を把握するため、病型、最終受診時視力およびインフリキシマブ治療効果と各遺伝因子の関連を調査した。

A. 研究目的

ベーチェット病は全身の諸臓器に急性の炎症を繰り返す原因不明の難治性疾患である。本病は内的遺伝因子の関与のもとに何らかの外的環境因子が作用して発症する多因子疾患と考えられている。内的遺伝因子としてHLA-B51抗原との顕著な相関が知られているが、本病発症にはHLA-B\*51アリル以外の他の遺伝子も関与している可能性が示唆される。我々はゲノム全域を網羅する多型性豊富な23,465個のマイクロサテライトマーカーおよび500,568個のSNPを用いてゲノムワイドな疾患遺伝子スクリーニングを行った結果、

ベーチェット病と相関を示す新たな疾患感受性遺伝子としてHLA-A\*26、IL10およびIL23R-IL12RB2を同定した。

本研究ではHLA-B\*51、HLA-A\*26、IL10およびIL23R-IL12RBの遺伝因子が本病の臨床像に与える影響を把握するため、病型、最終受診時視力およびインフリキシマブ治療効果と各遺伝因子の関連を調査した。

B. 研究方法

日本人ベーチェット病患者を対象に病型、最終受診時視力およびインフリキシマブの治療効果の臨床データを調査し、HLA-B\*51、

HLA-A\*26、IL10多型およびIL23R-IL12RB多型との関連を検討した。

(倫理面への配慮)

全ての血液提供者に対して研究の目的、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戴いた。得られた個人情報は連結匿名化の上、本研究に関わらない個人情報管理者により厳重に管理されている。

### C. 研究結果

①病型(表1)：完全型の患者群において、IL10のリスクアリル(rs1800872\_A)をホモで保有する割合が不全型の患者群に比して有意に上昇した(P=0.0012)。HLA-B\*51、HLA-A\*26およびIL23R-IL12RBリスクアリル(rs1495965\_G)では、完全型と不全型の患者群間でその保有率に有意な差は認められなかったが、HLA-B\*51とHLA-A\*26を各々ホモまたはヘテロで保有する割合が完全型の患者群において上昇した。IL23R-IL12RBのリスクアリル(rs1495965\_G)では、IL10のリスクアリル(rs1800872\_A)と同様に、リスクアリルをホモで保有する割合のみが完全型の患者群で上昇を示した。

②主症状(表2)：IL10のリスクアリル(rs1800872\_A)と4主症状の関連を検討した。4症状ともに、リスクアリルをホモで保有する群において、その割合が上昇した。

③視力予後(表3)：4遺伝因子ともに、リスクアリルをホモで保有する患者群において視力予後が不良になる傾向にあったが、いずれの遺伝因子においても視力予後との明確な関連は認められなかった。

④インフリキシマブ治療効果(表4)：い

ずれの遺伝因子においてもインフリキシマブの治療効果との関連は認められなかった。

### D. E. 考察と結論

IL10のリスクアリル(rs1800872\_A)が他の遺伝要因に比して、ベーチェット病の病態修飾に強く関与することが示唆された。ベーチェット病では、Th1優位の免疫応答が惹起されていることが報告されており、IL-10はそのTh1系の免疫応答に抑制的に働くサイトカインである。IL10のリスクアリルの保有がIL-10の発現量の低下に繋がることから(図1)、IL10のリスクアリルに由来するIL-10発現量の低下がベーチェット病の病態修飾に重要な役割を担っていると考えられた。

また、今回調査した4遺伝因子ともにインフリキシマブの治療効果に有意な影響を示さなかった。したがって、インフリキシマブの治療効果には他の要因が関与することが示唆された。

今後、さらにデータの解析を進め、ベーチェット病の遺伝因子と臨床像の相関を明らかにするとともに、疾患発症のメカニズムを解明していく。

### F. 健康危険情報

特記事項なし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Kawase K, Allingham RR, Meguro A, Mizuki N, Roos B, Solivan-Timpe FM, Robin AL, Ritch R, Fingert JH. Confirmation of TBK1 duplication in normal tension glaucoma. *Exp Eye Res.* 2012 Jan 2. [Epub ahead of print]
2. Kurihara Y, Arie Y, Iketani M, Ito

- H, Nishiyama K, Sato Y, Nakamura F, Mizuki N, Goshima Y, Takei K. The carboxyl-terminal region of Crtac1B/LOTUS acts as a functional domain in endogenous antagonism to Nogo receptor-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Jan 18. [Epub ahead of print]
3. Uemoto R, Nakasato-Sonn H, Kawagoe T, Akira M, Okada E, Mizuki N. Factors associated with enlargement of chorioretinal atrophy after intravitreal bevacizumab for myopic choroidal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2012 Jan 22. [Epub ahead of print]
  4. Horie Y, Meguro A, Kitaichi N, Lee EB, Kanda A, Noda K, Song YW, Park KS, Namba K, Ota M, Inoko H, Mizuki N, Ishida S, Ohno S. Replication of a microsatellite genome-wide association study of Behcet's disease in a Korean population. *Rheumatology.* 2012 Jan 18. [Epub ahead of print]
  5. Nakasato S, Uemoto R, Mizuki N. Thermocautery for Inferior Conjunctivochalasis. *Cornea.* 2012 Jan 12. [Epub ahead of print]
  6. Suzuki M, Suzuki T, Nagano A, Hirasawa M, Sakuyama K, Mizuki N. Cyclooxygenase inhibitor improved an exudative lesion of choroidal neovascularization in age-related macular degeneration. *Eur J Ophthalmol.* 2011 Jul 25:0. doi: 10.5301/ejo.5000032. [Epub ahead of print]
  7. Kawagoe T, Mizuki N. Sarcoidosis. *Curr Opin Ophthalmol.* 2011;22(6):502-7.
  8. Uemoto R, Nakasato-Sonn H, Meguro A, Okada E, Mizuki N. Anatomical and functional changes of retina following subretinal injection of high-speed fluid. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2011 Aug 20. [Epub ahead of print]
  9. Nishida T, Shibuya E, Asukata Y, Nakamura S, Ishihara M, Hayashi K, Takeno M, Ishigatsubo Y, Mizuki N. Clinical Course before and after Cataract and Glaucoma Surgery under Systemic Infliximab Therapy in Patients with Behcet's Disease. *Case Report Ophthalmol.* 2011;2(2):189-92.
  10. Ito R, Ota M, Meguro A, Katsuyama Y, Uemoto R, Nomura E, Nishide T, Kitaichi N, Horie Y, Namba K, Ohno S, Inoko H, Mizuki N. Investigation of association between TLR9 gene polymorphisms and VKH in Japanese patients. *Ocul Immunol Inflamm.* 2011;19(3):202-5.
  11. Yasumura R, Meguro A, Ota M, Nomura E, Uemoto R, Kashiwagi K, Mabuchi F, Iijima H, Kawase K, Yamamoto T, Nakamura M, Negi A, Sagara T, Nishida T, Inatani M, Tanihara H, Aihara M, Araie M, Fukuchi T, Abe H, Higashide T, Sugiyama K, Kanamoto T, Kiuchi Y, Iwase A, Ohno S, Inoko H, Mizuki N. Investigation of the association between SLC1A3 gene polymorphisms and normal tension glaucoma. *Mol*

- Vis. 2011;17:792-6.
12. Sato M, Kawagoe T, Meguro A, Ota M, Katsuyama Y, Ishihara M, Namba K, Kitaichi N, Morimoto S, Kaburaki T, Ando Y, Takenaka S, Ohno S, Inoko H, Mizuki N. Toll-like receptor 2 (TLR2) gene polymorphisms are not associated with sarcoidosis in the Japanese population. *Mol Vis.* 2011; 17:731-6.
  13. Yanagimachi M, Miyamae T, Naruto T, Hara T, Kikuchi M, Hara R, Imagawa T, Mori M, Kaneko T, Goto H, Morita S, Mizuki N, Kimura A, Yokota S. Association of HLA-A\*02:06 and HLA-DRB1\*04:05 with clinical subtypes of juvenile idiopathic arthritis. *J Hum Genet.* 2011;56(3): 196-9.
  14. Sada T, Ota M, Katsuyama Y, Meguro A, Nomura E, Uemoto R, Nishide T, Okada E, Ohno S, Inoko H, Mizuki N. Association analysis of Toll-like receptor 7 gene polymorphisms and Behçet's disease in Japanese patients. *Hum Immunol.* 2011;72(3):269-72.
- H. 知的財産権の出願、登録状況  
特記事項なし。



表1. ベーチェット病遺伝因子と病型

HLA-B	B51/B51	B51/others	others/others	<i>P</i>
完全型 (N=164)	0.085	0.439	0.476	0.17
不全型 (N=225)	0.044	0.413	0.542	

HLA-A	A26/A261	A26/others	others/others	<i>P</i>
完全型 (N=164)	0.030	0.390	0.579	0.055
不全型 (N=225)	0.004	0.324	0.671	

IL10 rs1800872	A/A	A/C	C/C	<i>P</i>
完全型 (N=186)	0.694	0.258	0.048	0.0012
不全型 (N=255)	0.522	0.408	0.071	

IL23R rs1495965	G/G	G/A	A/A	<i>P</i>
完全型 (N=186)	0.333	0.495	0.172	0.37
不全型 (N=255)	0.271	0.545	0.184	

表2. IL10リスクアリル(rs1800872\_A)と4主症状

	A/A (N=261)	A/C+C/C (N=179)	<i>P</i>
口腔内アフタ	0.989	0.972	0.20
皮膚症状	0.900	0.827	0.024
眼症状	0.893	0.827	0.046
外陰部潰瘍	0.648	0.553	0.046

表3. ベーチェット病遺伝因子と視力予後

HLA-B		IL10 rs1800872	
遺伝子型	最終視力0.1未満*	遺伝子型	最終視力0.1未満
B51/B51 (N=9)	5/9 (0.556)	A/A (N=58)	27/58 (0.466)
B51/others (N=47)	19/47 (0.404)	A/C (N=31)	11/31 (0.355)
others/others (N=43)	16/43 (0.372)	C/C (N=10)	2/10 (0.200)

HLA-A		IL23R rs1495965	
遺伝子型	最終視力0.1未満	遺伝子型	最終視力0.1未満
A26/A26 (N=1)	1/1 (1.000)	G/G (N=22)	12/22 (0.545)
A26/others (N=39)	13/39 (0.333)	G/A (N=47)	17/47 (0.362)
others/others (N=59)	26/59 (0.441)	A/A (N=30)	11/30 (0.367)

\*最終受診時視力0.1未満を視力予後不良とした

表4. ベーチェット病遺伝因子とインフリキシマブ治療効果

インフリキシマブ投与間隔(週)

HLA-B			IL10 rs1800872		
遺伝子型		平均	遺伝子型		平均
B51/B51	(N=3)	7.33	A/A	(N=11)	6.73
B51/others	(N=10)	6.70	A/C	(N=11)	6.55
others/others	(N=9)	6.33	C/C	(N=0)	-

HLA-A			IL23R rs1495965		
遺伝子型		平均	遺伝子型		平均
A26/A26	(N=1)	6.00	G/G	(N=2)	8.00
A26/others	(N=11)	6.82	G/A	(N=17)	6.88
others/others	(N=10)	6.00	A/A	(N=3)	7.00

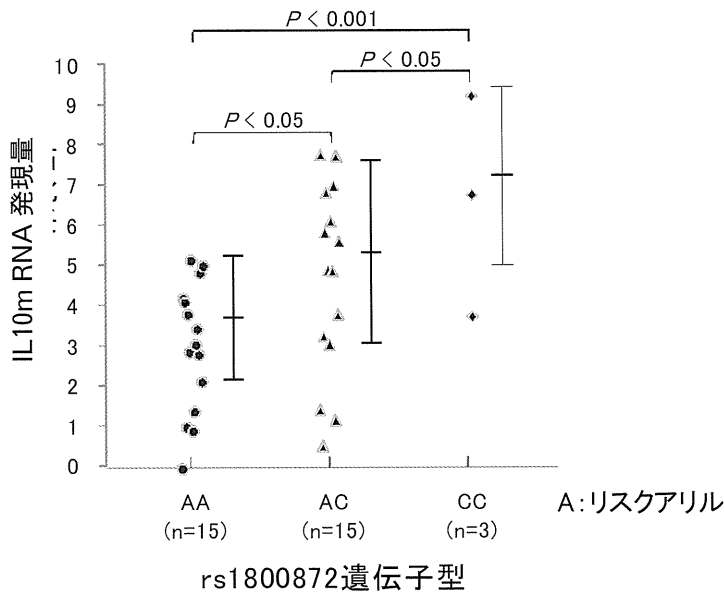


図1. IL10リスクSNPとIL-10 mRNA発現量の関連

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

神経ベーチェット病の治療ガイドライン作成に向けて

研究分担者 廣畑 俊 成 北里大学医学部膠原病感染内科  
菊地 弘 敏 帝京大学医学部内科  
桑名 正 隆 慶応義塾大学医学部内科  
沢田 哲 治 東京医科大学リウマチ膠原病内科  
永渕 裕 子 聖マリアンナ医科大学リウマチ膠原病アレルギー内科  
岳野 光 洋 横浜市立大学医学部病態免疫制御内科  
石ヶ坪良明 横浜市立大学医学部病態免疫制御内科

研究要旨

昨年度神経ベーチェット病の診断基準案を平成21年度案として公開したが、急性型神経ベーチェット病（ANB）の中でシクロスポリンにより誘導される一群があり、これが独自のclinical entityか否かは未だ明らかではない。それを検証するために、我々はこれまで集積した症例の2008年10月までの治療経過についてさらにアンケートを行った。

ANB全症例76例中26例においてシクロスポリン（2例はFK506）が使用されていた。シクロスポリン使用例では全例でぶどう膜炎を合併していたが、シクロスポリン非使用例では50例中43例にぶどう膜炎の合併が見られた。性別、HLA-B51、臨床症状、MRI所見、血清CRP、髄液所見などについては、両群間に有意な差は見られなかった。シクロスポリンの中止のみで改善した症例は約24%であったが、シクロスポリン非使用例でも約16%でステロイド治療なしに自然寛解がみられた。両群においては約80%以上で急性期に中等量以上のステロイドが投与され、パルス療法は約30%の症例で行われていた。これによりすべての症例で急性期の発作は改善したが、その後のANBの発作の再発率はシクロスポリン非使用群で有意に高かった（HR 8.452 [ 95%CI 1.330-10.89], p=0.0127）。シクロスポリン使用群での再発はシクロスポリンの非中止例であった。以上の結果より、シクロスポリン使用群もANBと見なすべきであると考えられた。すなわち、シクロスポリンはANB発症の重大なリスク因子としてとらえるべきであることが示唆された。

A. 研究目的

ベーチェット病の特殊病型である腸管ベーチェット、血管ベーチェット、神経ベーチェットは時に患者の生命予後を左右する重篤な病態でありながら、その診断と治療方法は未だ確立していない。特殊病型の診療のガイドラ

インを作成することはベーチェット病の予後の改善に大きく貢献するものである。然るに、神経ベーチェットを含む特殊病型について、過去の文献にはエビデンスレベルの高いものは見当たらない。そこで、1988年から2008年までに神経症状をきたしたベーチェット病患者

についての多施設後向きコホート調査を行ない、昨年度までに急性型神経ベーチェット (Acute NB) および慢性進行型神経ベーチェット (CPNB) の診断基準案を作成した。本年度よりは治療指針の作成に取り組んでいる。それに先立って、急性型神経ベーチェット病 (ANB) の中でシクロスポリンにより誘導される一群があり、これが独自の clinical entity か否かを明らかにするために、シクロスポリン未使用の ANB 患者との比較を行なった。

## B. 研究方法

1988年以降2008年までに、研究班に属する施設（横浜市立大学医学部附属病院、帝京大学医学部附属病院、東京医科大学附属病院、聖マリアンナ医科大学附属病院、慶應義塾大学医学部附属病院、北里大学病院）とその関連施設において入院または外来治療を行ったベーチェット病患者で神経症状を呈したものについて収集した調査票で、ANBと診断されたものについて2010年までの経過について追跡調査を行った。これらを基にして、種々のパラメーターについて、シクロスポリン使用例と非使用例について比較を行なった。

### （倫理面への配慮）

患者の個人情報漏洩することなく、プライバシーが保護されるように細心の注意を払う。2008年7月に改定された厚生労働省「臨床研究に関する倫理指針」を遵守し、研究内容については原則として各施設の倫理委員会の承認を受けることとする。

## C. 研究結果

ANB全症例76例中26例においてシクロスポリン（2例はFK506）が使用されていた。シクロスポリン使用例では全例でぶどう膜炎を合併していたが、シクロスポリン非使用例

では50例中43例にぶどう膜炎の合併が見られた。性別、HLA-B51、喫煙率、臨床症状（頭痛、発熱）、MRIの高信号域の有無についてはすべて両群間で有意差が無かった（表1）。また、シクロスポリンの中止のみで改善した症例は約24%であったが、シクロスポリン非使用例でも約16%でステロイド治療なしに自然寛解がみられた。シクロスポリン使用例と非使用例の両群においては約80%以上で急性期中等量以上のステロイドが投与され、パルス療法は約30%の症例で行われていた（表1）。血清CRP、髄液所見（図1）などについては、両群間に有意な差は見られなかった。

すべてのANB症例で急性期の発作は改善したが、その後のANBの発作の再発率はシクロスポリン非使用群で有意に高かった（図2）（HR 8.452 [ 95%CI 1.330-10.89],  $p=0.0127$ ）。シクロスポリン使用群での再発はシクロスポリンの非中止例であった。

## D. 考察

今期の注目すべき成果として、ANBの診断基準をみたす患者においてシクロスポリン使用例と非使用例については疫学的なパラメーターや臨床症状および検査所見において全く差がないことを明らかにした点である。さらに、その急性期の治療におけるステロイドの必要性、パルス療法の必要性についても大きな差が認められなかった。従って、シクロスポリンによって誘発される急性の神経症状は独自の clinical entity ではなく、ANBとしてとらえるべきであると考えられる。ただ、ANBの一つの亜型として診断基準に記載しておくことが望ましいと思われる。

興味深いことに、シクロスポリン誘発のANBはそうでないANBと比較して明らかに再発率が低かった。ただしシクロスポリンを再