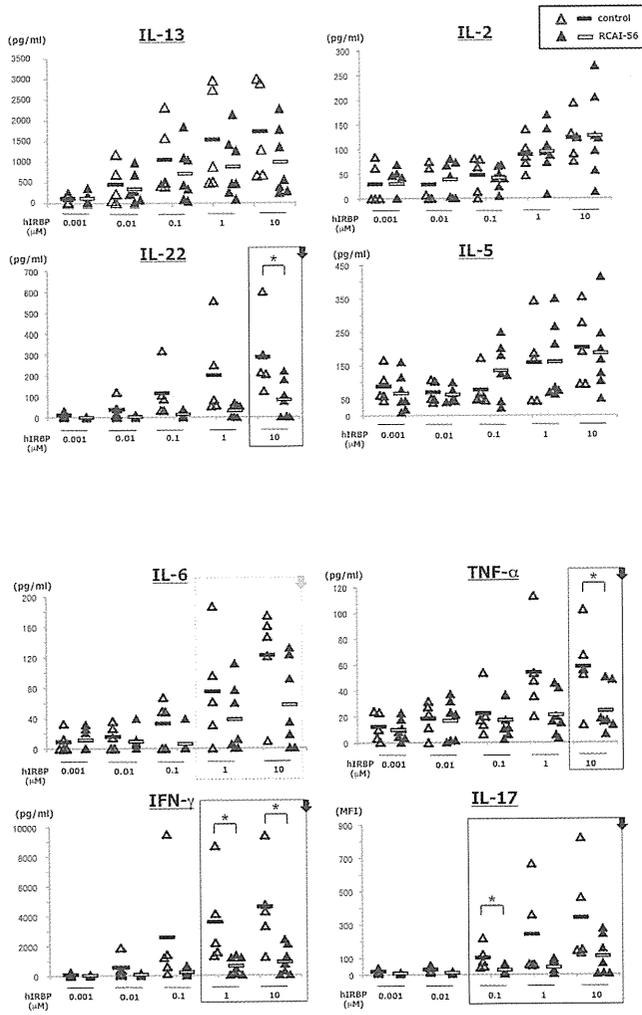


Ohno S, Ishida S, Onó K, Taniguchi, M, Yamamura T, Van Kaer L, Sonoda K-H, Iwabuchi K. The preventive effect of a novel ligand for natural killer T cells in the development of experimental autoimmune uveoretinitis. 15th International Conference on Behçet's Disease (Yokohama). 2012.7.15.

国内学会

1. 岩渕和也、MR1欠損はApoEノックアウトマウスの動脈硬化症の病巣進展を促進する、第101回日本病理学会総会（東京）、2012.4.28.
2. 岩渕和也、食餌誘導性肥満の進展におけるNKT細胞の促進的役割、第52回日本リンパ網内系学会総会（福島）、2012.6.16.
3. 江島耕二、篠原信賢、岩渕和也、NF- κ B-inducing kinase in non-hematopoietic cells is required for maintenance of normal number of $\gamma\delta$ T cells in periphery. 第22回京都Tセルカンファレンス（京都）、2012. 7.7.
4. 竹内恵美子、竹内康雄、江島耕二、篠原信賢、岩渕和也、TCR/MHC interactionを介したT細胞による自己反応性B細胞の監視、第22回京都Tセルカンファレンス（京都）、2012. 7.7.
5. 岩渕和也、ベーチェット病モデル動物の免疫異常とその制御、第40回日本臨床免疫学会総会（東京）、2012.9.28.
6. 玉内秀一、平賀伊保里、佐藤 雅、江島耕二、小茂鳥 潤、岩渕和也、ニッケル及びコバルトアレルギー反応にTh2型免疫反応は関与するか、第62回日本アレルギー学会秋季学術大会（大阪）、2012.12.1
7. Eshima K, Shinohara N, Iwabuchi K. Spontaneous increase of Gr-1⁺/CD11b⁺ cells *alymphoplasia* mouse lacking functional NF- κ B-inducing kinase. 第41回日本免疫学会総会・学術総会（神戸）、2012.12.5.
8. Satoh M, Eshima K, Tamauchi H, Takeuchi E, Iwabuchi K. Characterization of non-invariant NKT cells in visceral adipose tissue. 第41回日本免疫学会総会・学術総会（神戸）、2012.12.7.
9. Takeuchi E, Takeuchi Y, Shinohara N, Iwabuchi K. Dysfunction of selective suppression of auto-antibody production in SLE mice and reconstruction of this mechanism by induction of bone-marrow chimerism. 第41回日本免疫学会総会・学術総会（神戸）、2012.12.7.



H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

図 RCAI-56 予防的投与マウスにおける抗原特異的所 T 細胞のサイトカイン産生能
 抗原感作時に RCAI-56 投与 (▲; 平均は open bar) あるいは vehicle 投与 (Δ; 平均は closed bar) したマウスの感作部所属リンパ節 T 細胞を各濃度の hIRBP₁₋₂₀ (0.001~10 μM) 刺激培養上清中の各種サイトカイン濃度を測定した。実線・破線で囲んだ部分に有意差や傾向を認める。

厚生労働研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

IKK β 阻害薬によるラットぶどう膜炎モデルの軽症化

大野 重昭 北海道大学大学院 医学研究科 炎症眼科学講座
北市 伸義 北海道医療大学 個体差医療科学センター 眼科学
レニコフ アントン 北海道大学大学院 医学研究科 眼科学分野
南場 研一 北海道大学大学院 医学研究科 眼科学分野

研究要旨

〔目的〕 Nuclear factor (NF)- κ B は炎症反応の中心的役割を果たす転写因子の一つであり、生体内でアポトーシスや細胞増殖、炎症、分化なども制御する重要な因子である。新規化合物 IMD-0354 は I κ B キナーゼ (IKK) β リン酸化を特異的に阻害する。エンドトキシン誘導ぶどう膜炎 (EIU) はリポ多糖 (LPS) 投与により惹起される非特異的ぶどう膜炎モデルであり、NF- κ B が亢進している。今回我々は IKK β 阻害によるラット EIU に対する炎症軽減効果を検討した。

〔方法〕 LEW ラットに IMD-0354 を 30, 10, 3 mg/kg 腹腔内投与し、同時に LPS 200 μ g 皮下注射して EIU を誘導した。24 時間後に前房水の炎症評価と摘出眼球の免疫組織学的検討を行った。

〔結果〕 IMD-0354 腹腔内投与により用量依存的に前房内炎症細胞数、蛋白量、炎症性サイトカインが有意に減少し、ぶどう膜炎が軽症化した。ぶどう膜の免疫組織学的検討では NF- κ B 核内移行、および細胞質での I κ B α リン酸化が抑制されていた。さらにプロドラッグである IMD-1041 経口投与でも EIU は軽症化した。

〔まとめ〕 NF- κ B が炎症反応で中心的役割を果たすことはよく知られているが、正常の細胞活動でもはたしている経路であるため、副作用の面から今日まで薬剤開発は成功していない。今回炎症等の条件下でのみ活性化する IKK β を標的分子として設計された新規化合物が安全かつ有効な抗炎症効果を示した。

A. 研究目的

ベーチェット病眼病変に対する治療にはステロイド薬やシクロスポリンなどの免疫抑制薬、近年は生物学的製剤である抗 TNF- α 抗体等が用いられる。しかし、しばしば強いぶどう膜炎発作を繰り返して重篤な視機能障害をきたしたり、全身の感染症などで使用できないことがある。

Nuclear factor (NF)- κ B は炎症反応の中

心的役割を果たす転写因子の一つであるが、生体内でアポトーシスや細胞増殖、炎症、分化なども制御する重要な因子である。したがって非特異的な NF- κ B 経路の阻害では、抗炎症効果は期待できるが全身的副作用も同時に出現してしまう。

一方、細胞内で NF- κ B は阻害分子である I κ B α が I κ B キナーゼ (IKK) により細胞質内でリン酸化・分解されることで活性

化されて核内へ移行、転写因子として機能する。なかでも IKK β は炎症等の条件下でのみ活性化することから、IKK β を阻害することは正常の細胞活動に影響を与えることなく強力な抗炎症効果を得られる標的分子と考えられる。新規化合物 IMD-0354 とそのプロドラッグ IMD-1041 は I κ B キナーゼ (IKK) β リン酸化を極めて特異的に阻害する。

エンドトキシン誘発ぶどう膜炎 (EIU) はリポ多糖 (LPS) 投与により惹起される非特異的ぶどう膜炎モデルであり、NF- κ B が亢進している。今回我々は IKK β /NF- κ B 経路阻害によるラット EIU に対する炎症軽減効果を検討した。

B. 研究方法

LEW ラットに IMD-0354 を 30, 10, 3 mg/kg 腹腔内投与し、同時に LPS 200 μ g を皮下注射して EIU を誘導した。24 時間後に前房水と眼球を摘出した。

前房水中の炎症細胞数、蛋白濃度、炎症性サイトカイン濃度、ケモカイン濃度を測定し、摘出眼球ぶどう膜での NF- κ B 核内移行や I κ B α を免疫組織学的に検討した。

さらにそのプロドラッグであり、経口薬である IMD-1041 を投与して同様の検討を行った。

C. 研究結果

ぶどう膜炎の炎症極期である LPS 注射 24 時間後、前房水中の炎症細胞数、蛋白濃度はいずれも IMD-0354 の濃度依存的に有意に減少した ($p < 0.01$)。炎症性サイトカイン TNF- α 、ケモカイン MCP-1 はいずれも薬剤投与により有意に減少した ($P < 0.05$, $p < 0.01$)。

摘出眼球のぶどう膜 (毛様体) では NF- κ B p 65 の核内移行細胞数が薬剤投与群で有意に減少した ($p < 0.05$)。細胞質内では

I κ B α リン酸化が薬剤投与により抑制されていた。

プロドラッグでも前房水中炎症細胞数と蛋白濃度が有意に減少した ($p < 0.05$)。

D. E. 考察と結論

NF- κ B 経路が炎症反応の中心であることはよく知られているが、正常の細胞活動にも必要な経路であるため、これまで副作用の問題から有効な薬剤が開発されなかった。本研究では NF- κ B 経路の分子機構を考え、炎症条件下でのみ活性化する IKK β に極めて特異性の高い化合物を開発した。本研究では急性ぶどう膜炎の動物モデルで高い有効性が示され、同時に特に全身副作用は見られなかった。また他疾患領域で開始されているヒト臨床試験でもこれまで目立った副作用が報告されていないことから、IMD-0354/-1041 は安全かつ有効性の高い新規薬剤候補と考えられた。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Horie Y, Meguro A, Kitaichi N, Lee E B, Kanda A, Noda K, Song Y W, Park K S, Namba K, Ota M, Inoko H, Mizuki N, Ishida S, Ohno S. Replication of a microsatellite genome-wide association study of Behcet disease in a Korean population. *Rheumatology*. 2012; 51: 983-986
2. Ishijima K, Namba K, Ohno S, Mochizuki K, Ishida S. Intravitreal injection of bevacizumab in a case of occlusive retinal vasculitis

- accompanied with syphilitic intraocular inflammation. Case Report Ophthalmol. 2012; 3: 434-437
3. Iwata D, Namba K, Mizuuchi K, Kitaichi N, Kase S, Takemoto Y, Ohno S, Ishida S. Correlation between elevation of serum antinuclear antibody titre and decreased therapeutic efficacy in the treatment of Behçet's disease with infliximab. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2012; 250: 1081-108
 4. Okada AA, Goto H, Ohno S, Mochizuki M, Kitaichi N, Namba K, Keino H, Watanabe T, Ishibashi T, Ito T, Sonoda K, Nakai K, Ohguro N, Sugita S, Kezuka T, Kaburaki T, Takamoto M, Mizuki N. Multicenter study of infliximab for refractory uveoretinitis in Behcet disease. Arch Ophthalmol. 2012; 130: 592-598
 5. Lennikov A, Kitaichi N, Noda K, Ando R, Dong Z, Fukuhara J, Kinoshita S, Namba K, Mizutani M, Fujikawa T, Itai A, Ohno S, Ishida S. Amelioration of endotoxin-induced uveitis treated with an I κ B kinase β inhibitor in rats. Mol Vis. 2012; 18: 2586-2597
 6. Saito M, Yoshida K, Saito W, Fujiya A, Ohgami K, Kitaichi N, Tsukahara H, Ishida S, Ohno S. Astaxanthin increases choroidal blood flow velocity. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2012; 250: 239-245
2. 学会発表
1. Kitaichi N, Dong Z, Iwata D, Takeuchi M, Namba K, Noda K, Kanda A, Iwabuchi K, Yamagishi S, Ohno S, Ishida S. Amelioration of experimental autoimmune uveoretinitis by inhibition of Glyceraldehyde-derived AGEs formation. 15th International Conference on Behcet's Disease : Yokohama, Japan (2012)
 2. Namba K, Iwata D, Mizuuchi K, Kitaichi N, Kase S, Takemoto Y, Ohno S, Ishida S. Correlation between development of antinuclear antibody titre and decreased therapeutic efficacy in the treatment of Behçet's disease with infliximab. 15th International Conference on Behcet's Disease : Yokohama, Japan (2012)
 3. Takemoto Y, Namba K, Kitaichi N, Mizuuchi K, Ohno S, Ishida S. Effects of Infliximab Therapy in Behcet's disease. 15th International Conference on Behcet's Disease : Yokohama, Japan (2012)
 4. Dong Z, Kitaichi N, Iwata D, Ando R, Fukuhara J, Lennikov A, Kanda A, Noda K, Ohno S, Ishida S. Amelioration of experimental autoimmune uveoretinitis by inhibition of toxic AGEs formation. ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) Annual Meeting: Fort Lauderdale, USA (2012)
 5. Lennikov A, Kitaichi N, Noda K, Ando R, Dong Z, Namba K, Ohno S, Ishida S. Amelioration of endotoxin-induced uveitis treated with an IKK kinase inhibitor, IMD-0354 in rats. ARVO (Association for Research in

- Vision and Ophthalmology) Annual Meeting: Fort Lauderdale, USA (2012)
6. Namba K, Kaburaki T, Sonoda KH, Ohno S, Ocular Behcet's Disease Research Group of Japan. Novel scoring system of ocular lesions in Behcet's disease. 8th International Symposium on Uveitis: Sani Beach, Greece (2012)
 7. Ohno S. Epidemiology and genetics of Behcet's disease. Behcet's Disease Symposium; How to differentiate Behcet's disease from other types of uveitis. 8th International Symposium on Uveitis: Sani Beach, Greece (2012)
 8. Ohno S. Silk route disease: epidemiology and genetics. International Conference on Behcet's Disease: Rome, Italy (2012)
 9. Ohno S. Ocular lesions in Behcet's disease. 16th Afro-Asian Congress of Ophthalmology: Istanbul, Turkey (2012)
 10. Ohno S. Prevention of Blindness due to Infectious and Inflammatory Ocular Diseases. World Ophthalmology Congress 2012: Abu Dhabi, United Arab Emirates(2012)
 11. Ohno S. Symposium on Genetics of Ocular Inflammatory Disorders: Genetics of Behcet's Disease. World Ophthalmology Congress 2012: Abu Dhabi, United Arab Emirates(2012)
 12. Ohno S. Immunological Aspects of Behcet's Disease. 7th International Convention for Patients with Silk Road Disease (Behcet's Disease): Yokohama, Japan(2012)
 13. Ohno S. Anti-TNF α Therapy for Intractable Uveoretinitis in Behcet's Disease: 15th International Conference on Behcet's Disease : Yokohama, Japan (2012)
 14. Ohno S. From autoimmunity to autoinflammation in the immunopathogenesis of Behcet's disease. Japan-Korea Ophthalmology Symposium: Sapporo, Japan(2012)
 15. Ohno S, Chin S. Management of secondary glaucoma in uveitis. Thimpu National Referral Hospital Ophthalmology Seminar: Thimpu, Bhutan(2012)
 16. Ohno S. Corticosteroid therapy in uveitis. Thimpu National Referral Hospital Ophthalmology Seminar: Thimpu, Bhutan(2012)
 17. Ohno S. Management dilemmas in uveitis. Second Biennial National Conference, Bangladesh Uvea Society: Dhaka, Bangladesh(2012)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
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

ベーチェット病の病態と IL-22 の関係について

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

我々はこれまでベーチェット病 (BD) における Th 17 の役割を追究してきた。BD 末梢血 Th 17 の比率は健常人と比較しその比率が増加し、CCR 6-CCL 20 の刺激により CD 4⁺T 細胞の遊走が増強したことから、Th 17 が病変部に浸潤し病変形成に関与している可能性を示してきた。Th 17 は IL-17 のほか IL-22 も産生することが知られているが、最近 IL-17 を産生せずに IL-22 を産生する T 細胞サブセット (Th 22) の存在が明らかとなった。IL-22 は生体内での役割から BD の病変に対して protective に働く可能性があることから、今回は IL-22 に着目し、BD の病態との関連について追究した。

対象は BD 23 例（活動期 11 例、非活動期 12 例）および健常人 13 例、同じサンプルで血漿 IL-22 および IL-17 濃度を ELISA で測定し、患者情報と比較検討した。血漿 IL-17 濃度は健常人と比較し、活動期 BD で高値であったのに対し、IL-22 濃度は活動期 BD で低値であった。活動期と非活動期にわけて IL-17 と IL-22 の相関をみると活動期では正、非活動期は負の相関の傾向を示し、その分布は異なっていた。眼病変の活動期に治療し改善した 4 症例における前後での検討では IL-22 濃度は不変ないし上昇し、疾患活動性の変化と逆相関していた。以上より、BD において血漿 IL-22 濃度は病勢とは逆の動態を示し、BD の病態に抑制的に作用している可能性が考えられた。

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るが、病変部組織ではリンパ球や好中球などの炎症性細胞の浸潤が認められ、これらが病態に関与していると考えられている。これまで BD では CD 4⁺T 細胞について多く検討が行われ、CD 4⁺T 細胞は細胞性免疫を誘導する Th 1 にシフトしていることが報告されている。昨年度まで我々は IL-17 産生を特徴とする Th 17 サブセットに注目して検討し、末梢血中の比率が BD で健常人よりも高値で、CCR 6-CCL 20 の刺激により

CD 4⁺T 細胞の遊走が増強していたことから、Th 17 が病変部に浸潤し病変形成に関与している可能性を示してきた。Th 17 は様々なサイトカインを産生するが、IL-17 以外に IL-22 も産生することが知られている。一方最近、IL-17 は産生しないものの IL-22 を産生する Th 22 サブセットが報告された。IL-22 は IL-10 ファミリーに属するサイトカインの一つで、T 細胞、NK 細胞、NK-T 細胞などのリンパ球および上皮細胞で産生される。一方で IL-22 のレセプターは主に上皮細胞に発現し、IL-22 の刺激を介して lipocalin、 β -

defencin や S 100 などの抗菌タンパクの産生や再生の促進、組織傷害の保護に関わることが知られており、病態に対し抑制的に働く可能性がある。そこで今回は Th 22 が産生する IL-22 に着目し、Th 17 が産生する IL-17 と比較検討することにより、IL-22 の病態における役割を追究した。

B. 研究方法

1. 対象

厚生労働省 BD 診断基準を満たす BD 23 例。健常人 13 例を対照として用いた。BD 患者の臨床情報はカルテより履歴的に収集した。BD 患者の臨床特徴を表 1 に示す。

2. 血漿 IL-22 および IL-17 濃度の測定

血漿はヘパリン採血した末梢血を遠心し、分離した。血漿 IL-22 および IL-17 濃度の測定は ELISA (R&D systems) を用いて測定した。

3. 統計学的解析

二群間の比較は Mann-Whitney U-test で検討し、 $p < 0.05$ を有意とした。

(倫理面への配慮)

本研究内容は学内の倫理委員会で承認され、すべての症例で事前に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

同一症例をもちいて血漿 IL-17 濃度と IL-22 濃度を ELISA で測定したところ、血漿 IL-17 濃度は、健常人と比較し活動期 BD で高値であった (27.2 ± 1.3 pg/ml vs 29.7 ± 4.0 pg/ml, $p < 0.05$) のに対し、IL-22 濃度は活動期 BD で低値であった (図 1)

(3.1 ± 2.1 pg/ml vs 1.4 ± 1.8 pg/ml, $p < 0.05$)。

そこで健常人および BD 患者全体に分けて IL-17 (x) と IL-22 (y) の相関をみると健常人は正、では負の相関の傾向を認めた。さらに BD 患者を活動期と非活動期にわけて IL-17 (x) と IL-22 (y) の相関をみると活動期では有意ではなかったものの正 ($y = 0.13x - 2.54$, $r = 0.30$)、非活動期は負 ($y = -0.46x + 16.2$, $r = -0.24$) の相関の傾向を示し (図 2)、活動期および非活動期ではその分布は異なっていた。

また、眼病変の活動期に治療し、改善した 4 例における前後での検討では、疾患活動性の低下にともなって IL-22 濃度は 4 例中 2 例で不変、2 例で上昇を認め、実際に疾患活動性の変化と血漿 IL-22 濃度の推移が逆相関する症例が存在した。

D. 考察

BD 患者末梢血中では健常人と比較し、活動期に血漿 IL-22 が低下、IL-17 が上昇していたことから、血漿 IL-22 濃度が活動性と逆相関する可能性が考えられた。実際、同一症例で測定した IL-17 濃度と IL-22 濃度を同時にプロットしてみると、活動期と非活動期で分布が異なることが示され、活動期には正、非活動期には負の相関の傾向を示した。IL-22 は Th 22 および Th 17 のいずれからも産生されることから、この結果は、活動期には Th 17 が優位になることにより両方が産生され、逆に非活動期には Th 22 が活性化し、IL-22 のみが優位に産生される可能性が推察される。またこれら二つのサブセットはケモカインレセプターの発現が異なり、Th 22 は CCR 10 を発現するが、Th 17 では発現しないことが知られている。この事実はこれら T 細胞サブセットの組織への浸潤が対応するケモカインである CCL 27 の発現により調節さ

れている可能性を示唆しており、ケモカインバランスを治療標的とした新たな治療介入により病態を修飾できるかもしれない。

ただし今回の検討では症例数が少なく、有意な相関は得られなかったことから症例数を増やして検討する必要があると考える。また、IL-22 を産生する細胞群としてはNK細胞などその他のリンパ球サブセットが存在することから、IL-22 のソースとなる細胞がいずれのサブセット由来によるものか、今後さらなる検討が必要と考えられた。

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

E. 結論

ベーチェット病において血漿 IL-22 濃度は病勢とは逆の動態を示し、ベーチェット病の病態に抑制的に作用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

なし

2. 学会発表

1) Yasuoka H, Chen Z, Takeuchi T, Kuwana M: Mechanism of the recruitment of Th 17 in the pathogenic process of Behçet's disease. 15th International Conference on Behçet's Disease (Yokohama). 2012. 7.

2) Kuwana M: Roles of T lymphocytes in pathogenesis of Behçet's disease. 15th International Conference on Behçet's Disease (Yokohama). 2012. 7.

H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得

表 1. ベーチェット病患者23例の臨床特徴

活動期 : 非活動期	12 : 11
男性 : 女性	11 : 12
採血時年齢 (yrs)	46.1 ± 11.8
HLA-B51(+)	15/23 (65 %)
完全型 : 不全型	13/23 (57 %)
眼病変(全経過)	18/23 (78 %)

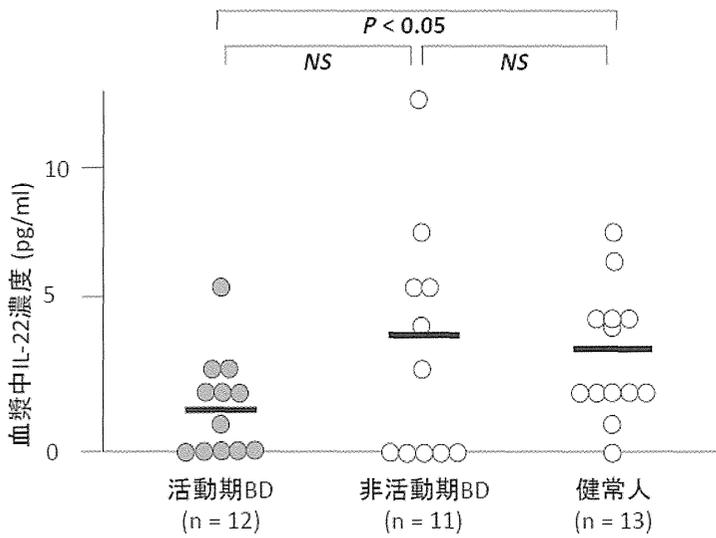


図 1. ベーチェット病(BD)および健常人における血漿IL-22濃度. ELISAで血漿IL-22濃度を測定した結果を示す.

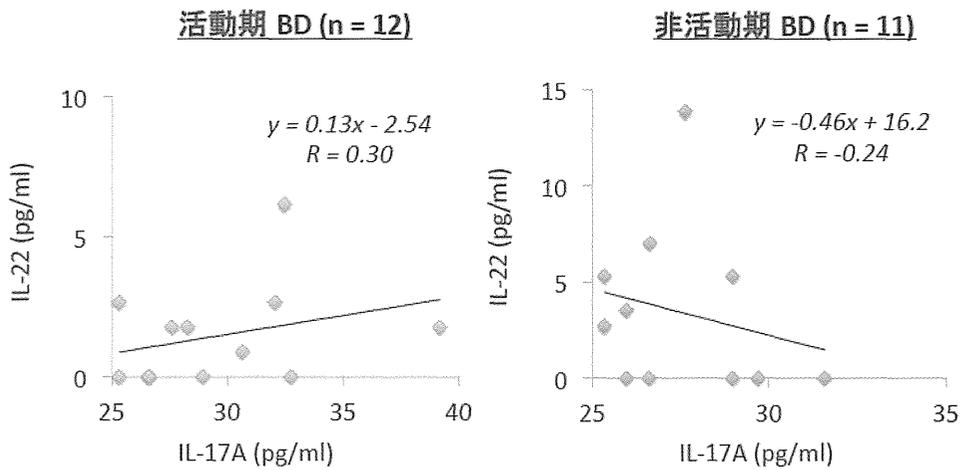


図 2. 活動期および非活動期ベーチェット病における血漿IL-22およびIL-17A濃度の分布.

ベーチェット病 CD4+リンパ球における IL-23 受容体の動態

研究分担者名・役職名: 教授 鈴木 登

(聖マリアンナ医大 免疫・病害動物学、 同 難病治療研究センター)

研究要旨: われわれは、ベーチェット病 (BD) における Th 17 細胞について検討した。その結果 BD 末梢血において Th 17 細胞の割合が健常人に比し有意に増加していた。さらにナイーブ CD4+T 細胞の刺激・培養試験では、Th 1 刺激では IL-12 受容体の過剰な遺伝子発現が、Th 17 刺激では IL-23 受容体の過剰な遺伝子発現が観察され、このことは Th 17 および Th 1 細胞ともに過剰産生される可能性を示す。これより本年度は BD 末梢血メモリー CD4+T 細胞における IL-23 受容体の発現を検討したところ、Th 17 細胞の頻度と IL-23 受容体陽性細胞頻度が相関して観察された。これらの結果より IL-23 受容体からの過度な刺激入力、Th 17 細胞を増加させることによって BD の病態に関与している可能性があるかと推察する。

A. 研究目的 → われわれは、ベーチェット病 (BD) における Th 17 細胞について検討し、その結果 BD 末梢血において Th 17 細胞の割合が健常人に比し有意に増加しており、さらにナイーブ CD4+T 細胞の刺激・培養試験では、Th 1 刺激では IL-12 受容体を介して、Th 17 では IL-23 受容体を介してともに過反応を惹起しうることを発見した。このことは BD では Th 17 型と Th 1 型のアレルギーが共存していることを推察させる。

本年度はこの結果を受け BD 末梢血メモリー CD4+T 細胞における IL-23 受容体の発現を検討し、BD 病態を詳細に検討することによって、この難病に対する適切なコントロールの探索に寄与することを目的とする。

B. 研究方法 (倫理面の配慮) →

(1)-1 対象: BD 7 例、コントロール 6 例。

(1)-2 方法: 末梢血よりメモリー CD4+T 細胞を抽出。そのまま、細胞表面の IL-23 受容体および細胞内染色にて IFN γ /IL-17 を同時に染色。フローサイトメーターで細胞頻度を観察した。

(2) (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聖マリアンナ医科大学倫理委員会での承認を得た (臨床試験部会: 第 905 号承認)。

具体的には、実施にあたっては必ず患者本人からの文書による同意を得る。試験実施に係る生データ類および、同意書等を取扱う際は、被験者の秘密保護に十分配慮する。データは聖マリアンナ医科大学免疫学・病害動物学の外には持ち出さない。試験の結果を公表する際は、被験者を特定できる情報を含めないようにする。

C. 研究結果

1. 今回の末梢血メモリー CD4+T 細胞の解析においては、Th 17 細胞頻度は BD にて増加傾向にあった。

2. 末梢血メモリー CD4+T 細胞における IL-23 R 陽性細胞頻度においても増加傾向が認められた。

3. Th 17 細胞頻度と、IL-23 R 陽性細胞頻度の間には正の相関関係が認められた。

D. 考察

Th 17 細胞の維持増殖には IL-23 の刺激が必須である。われわれは、BD の CD 4+T 細胞において IL-23 の過剰刺激が存在することを報告したが (下記報告論文 3)、本年度の研究にてその現象が IL-23 受容体の過剰産生による可能性を明らかにした。このことは横浜市立大学等より報告されている BD の GWAS 研究にて、IL-23 受容体遺伝子が疾患感受性を持つとした結果と反しない。リンパ球上の IL-23 受容体の検討は短時間かつ容易に実施できうため、外来における BD の適切なコントロールの把握にもつながる可能性があると考ええる。

E. 結論

IL-23 受容体からの刺激入力 が BD の Th 17 細胞増加に寄与し、そのことが BD の病因に関与する可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Shimizu J, Izumi T, Suzuki N. Aberrant activation of Heat Shock Protein 60/65 reactive T cells in patients with Behcet's Disease. *Autoimmune Dis.* doi:10.1155/2012/105205, 2012.
2. Shimizu J, Izumi T, Arimitsu N, Fujiwara N, Ueda Y, Wakisaka S, Yoshikawa H, Kaneko F, Suzuki T, Takai K, Suzuki N. Skewed TGF β /S

mad signaling pathway of T cells in patients with Behçet's disease. *Clin Exp Rheumatol.* 30(Suppl.72), S 35-S 39, 2012.

3. Shimizu J, Takai K, Fujiwara N, Arimitsu N, Ueda Y, Wakisaka S, Yoshikawa H, Kaneko F, Suzuki T, Suzuki N. Excessive CD 4+ T cells co-expressing interleukin-17 and interferon- γ in patients with Behçet's disease. *Clin Exp Immunol.*168: 68-74, 2012.

2. 学会発表

清水潤、鈴木登. ベーチェット病における IL-17+ IFN γ + CD 4+細胞の存在. 第 56 回 日本リウマチ学会総会・学術総会(東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特記事項なし

ベーチェット病に関する調査研究

研究分担者名・役職名: 猪子 英俊・教授

研究要旨:

A. 研究目的

ベーチェット病は環境要因と遺伝要因が互いに作用し合う多因子疾患であり、様々な側面からの基礎研究が病態解明には必須である。我々は、ベーチェット病に関与する遺伝子の特定およびその機能から、病態解明を試みている。

これまでに多段階によるベーチェット病患者-健常者間における関連解析により、TRIM 39 上の SNP(rs 2074474)に強い感受性を見出している。さらに連鎖不平衡解析により、Rpp 21 上の rs 974963 が rs 2074474 と強い LD ($r^2 > 0.9$) にあり、グリシンからリシンへの置換を伴う SNP であることを見出した。近年、cGMP-依存性タンパク質キナーゼ I をベイトとしたイーストツーハイブリッド法によるスクリーニングにより、TRIM 39 および Rpp 21 遺伝子におけるインタージェニックプライミングによる、mRNA から翻訳されるキメラタンパク質 (TRIM 39-Rpp 21: TRIM 39 R) が相互作用分子として同定された。TRIM 39 R は TRIM 39 の SPRY ドメインの途中から Rpp 21 の酵素活性ドメインを含むタンパク質構造である。公共のデータベースによっては、TRIM 39 のスプライシングバリエントの 1 つとして登録されており、TRIM 39 R は rs 2074474 と rs 974963 のどちらもコードする。

そこで今年度は、ベーチェット病に関与する分子が、野生型 TRIM 39 (TRIM 39 B)、TRIM 39 R および Rpp 21 のうち、いずれ

であるかについて検討することと、その分子の機能解析を目的として、各遺伝子の過剰発現系をヒト胎児腎細胞株の HEK 293 T 細胞を用いて樹立し、マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を行った。

B. 研究方法 (倫理面の配慮)

(1) 具体的な研究方法

遺伝子発現ベクター作製法

ヒト骨髄由来 totalRNA より合成した cDNA をテンプレートとし、センス側に EcoRI、アンチセンス側に EcoRV 切断サイトを付加したプライマーペアを用いて、TRIM 39 B、TRIM 39 R および Rpp 21 を PCR 法にて増幅した。産物を EcoRI と EcoRV (New England Biolabs) の制限酵素を用いて、37 °C NEB 3 Buffer mix 中で 3 時間ダブルダイゼクションを行い、フェノール抽出によって精製した。pcDNA 6/V 5-His B ベクター (invitrogen) を EcoRI と EcoRV の制限酵素でダブルダイゼクション後、Calf intestinal alkaline phosphatase (TaKaRa) を用いて脱リン酸化反応後、フェノール抽出によって精製した。制限酵素処理を行ったインサートとベクターを混合し、Mighty Mix DNA Ligation Kit (TaKaRa) を用いて、16 °C で 30 分間ライゲーションを行った。

細胞培養法

ヒト胎児腎臓由来培養細胞の HEK 293 T は 10 % Fatal Bovine Serum (FBS,

Thermo SCIENTIFIC) 含有 D-MEM を培養液として用い、37 °C 5 % CO₂ で培養した。

トランスフェクション法

Fugene HD (promega) を用いてリポフェクション法にて、GFP 遺伝子と共トランスフェクションを行なった。pcDNA 6.2 em GFP 1 μg、エフェクター 1 μg および Fugene H 6 μl を Opti-MEM で 50 μl に調整した溶液をピペティングによって攪拌し、24 wells 培養プレートにアプライした。5 × 10⁵ 個の HEK 293 T 細胞を含んだ D-MEM 500 μl を上からかけて、リバーストランスフェクションを行った。トランスフェクション後、37 °C 5 %CO₂ で 48 時間後に細胞を回収した。

マイクロアレイ法

TRIM 39 B、TRIM 39 R、Rpp 21 およびコントロールとして空ベクターをそれぞれ過剰発現させた HEK 293 T より、TRIzol (Life-technologies) を用いて total RNA を抽出し、バイオアナライザ (Agilent) を用いて、RNA の品質チェックをおこなった。Agilent の実験プロトコルに従って 1 色法でラベル化を行い、SurePrint G3 Human GE 8 X 60 K v2 (Agilent) を用いてハイブリダイゼーション、洗浄後、Sure Scan マイクロアレイスキャナ (Agilent) でスライドを読み取り、数値化を行った。データの解析には GeneSpring (Agilent) ソフトウェアを用いて行った。

(2) 倫理面への配慮

本研究で用いたヒト骨髄由来 totalRNA およびヒト胎児腎臓由来培養細胞の HEK 293 T は市販されているものを用いたため、倫理面の問題はない。

C. 研究結果

遺伝子過剰発現系 HEK 293 T 細胞の樹立

CMV プロモーターを有する pcDNA 6/V 5-His B ベクターにヒト骨髄由来の TRIM 39 B、TRIM 39 R、Rpp 21 の cDNA を組み込んで、各遺伝子の発現ベクターを作製し、ヒト胎児腎細胞由来細胞株 HEK 293 T に GFP 発現ベクターの pcDNA 6.2 emGFP とともにトランスフェクションを行った。十分に遺伝子を発現させた 48 時間後に蛍光観察によって、GFP の蛍光が見られ、トランスフェクションされたことを確認した。また、内因性の TRIM 39 と区別するために、V 5 epitope タグに対する抗体を用いてウェスタンブロッティングを行い、インサートの各遺伝子が過剰発現されていることを確認した。これらの結果から、遺伝子過剰発現系 HEK 293 T 細胞の樹立を確認した (図 1)。

マイクロアレイ解析

各遺伝子とコントロールとして空ベクターをそれぞれ 4 サンプルずつ、過剰発現系 HEK 293 T 細胞を作成し、蛍光観察によって、遺伝子の導入を確認した後、マイクロアレイを行った。コントロールをリファレンスとした各遺伝子の解析の結果、発現量が有意に変動した遺伝子が、TRIM 39 B では 34 個、TRIM 39 R では 42 個、Rpp 21 では 0 個であった。また、このうち、TRIM 39 B と TRIM 39 R で共通の遺伝子は 8 個であった。TRIM 39 B および TRIM 39 B と TRIM 39 R で共通の遺伝子には、免疫応答に関与する遺伝子は見られなかった。一方、TRIM 39 R が誘導する遺伝子は、免疫に関与するものがほとんどであった。そこで、Gene Ontology 解析を行い、同定した遺伝子から予測される、TRIM 39 R が制御するパスウェ

イを有意差の大きい順にリスト化した。その結果、ウイルスや細菌感染および1型IFN応答に関与するパスウェイが多数予測された(図2)。

D. 考察

TRIM 39 B、TRIM 39 R および Rpp 21 の過剰発現系 HEK 293 T 細胞のマイクロアレイによる遺伝子発現解析の結果、TRIM 39 R の系のみで、ウイルスや細菌感染および1型IFN 応答に関与するパスウェイが予測された。このことから、TRIM 39 R がウイルスや細菌感染および1型IFN 応答に関与することを示唆し、Th 1 型の免疫応答に関与することが示唆された。また、ベーチェット病の病態において、TRIM 39 R は炎症応答に関与すると考えられる。ベーチェット病患者-健康者間の関連解析が示した有意差は、TRIM 39 R を示している可能性が考えられた。

E. 結論

TRIM 39 および、その近傍の Rpp 21 遺伝子過剰発現系 HEK 293 T 細胞のマイクロアレイによる遺伝子発現解析により、TRIM 39 と Rpp 21 のキメラタンパク質である、TRIM 39 R がウイルスや細菌感染および1型IFN 応答に関与することが示唆された。TRIM 39 R のさらなる機能解析により、新たな免疫システムが解明され、それがベーチェット病への理解、新たな診断基準および治療方法などに繋がる有意義なものと確信する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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* (Oxford) 51(6) 983-6 2012
2. Meguro A, Ideta H, Ota M, Ito N, Ideta R, Yonemoto J, Takeuchi M, Uemoto R, Nishide T, Iijima Y, Kawagoe T, Okada E, Shiota T, Hagihara Y, Oka A, Inoko H, Mizuki N Common variants in the COL4A4 gene confer susceptibility to lattice degeneration of the retina. *Plos One* 7(6) e39300 2012
3. Oka A, Mabuchi T, Ozawa A, Inoko H Current understanding of human genetics and genetic analysis of psoriasis. *J Dermatol* 39 231-241 2012
4. Sakuyama K, Meguro A, Ota M, Ishihara M, Uemoto R, Ito H, Okada E, Namba K, Kitaichi N, Morimoto S, Kaburaki T, Ando Y, Takenaka S, Yuasa T, Ohno S, Inoko H, Mizuki N Lack of association between IL10 polymorphisms and sarcoidosis in Japanese patients. *Mol Vis* 18 512-518 2012
5. Mitsunaga S, Suzuki Y, Kuwana M, Sato S, Kaneko Y, Homma Y, Narita A, Kashiwase K, Okudaira Y, Inoue I, Kulski JK, Inoko H Associations

between six classical HLA loci and rheumatoid arthritis: a comprehensive analysis. *Tissue Antigens* 80 16-25 2012

6. Shiina T, Suzuki S, Ozaki Y, Taira H, Kikkawa E, Shigenari A, Oka A, Umemura T, Joshita S, Takahashi O, Hayashi Y, Paumen M, Katsuyama Y, Mitsunaga S, Ota M, Kulski JK, Inoko H Super high resolution for single molecule-sequence-based typing of classical HLA loci at the 8-digit level using next generation sequencers. *Tissue Antigens* 80 305-316 2012
7. Suzuki H, Ota M, Meguro A, Katsuyama Y, Kawagoe T, Ishihara M, Asukata Y, Takeuchi M, Ito N, Shibuya E, Nomura E, Uemoto R, Nishide T, Namba K, Kitaichi N, Morimoto S, Kaburaki T, Ando Y, Takenaka S, Nakamura J, Saeki K, Ohno S, Inoko H, Mizuki N Genetic characterization and susceptibility for sarcoidosis in Japanese patients: risk Factors of BTNL2 gene polymorphisms and HLA class II alleles. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53 7109-7115 2012

講演発表

1. 倉田里穂、中岡博史、田嶋敦、米沢朋、猪子英俊 第21回日本組織適合性学会 HLA 領域に位置する新規ベータ2マイクロglobulin遺伝子の炎症応答に関する機能解析 2012
2. 猪子英俊 第56回日本リウマチ学会総会・学術集会シンポジウム「リウマチ性疾患の疾患感受性遺伝子」ベータ2マイクロglobulin病と

関節リウマチの遺伝子解析 2012

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

I. 図表

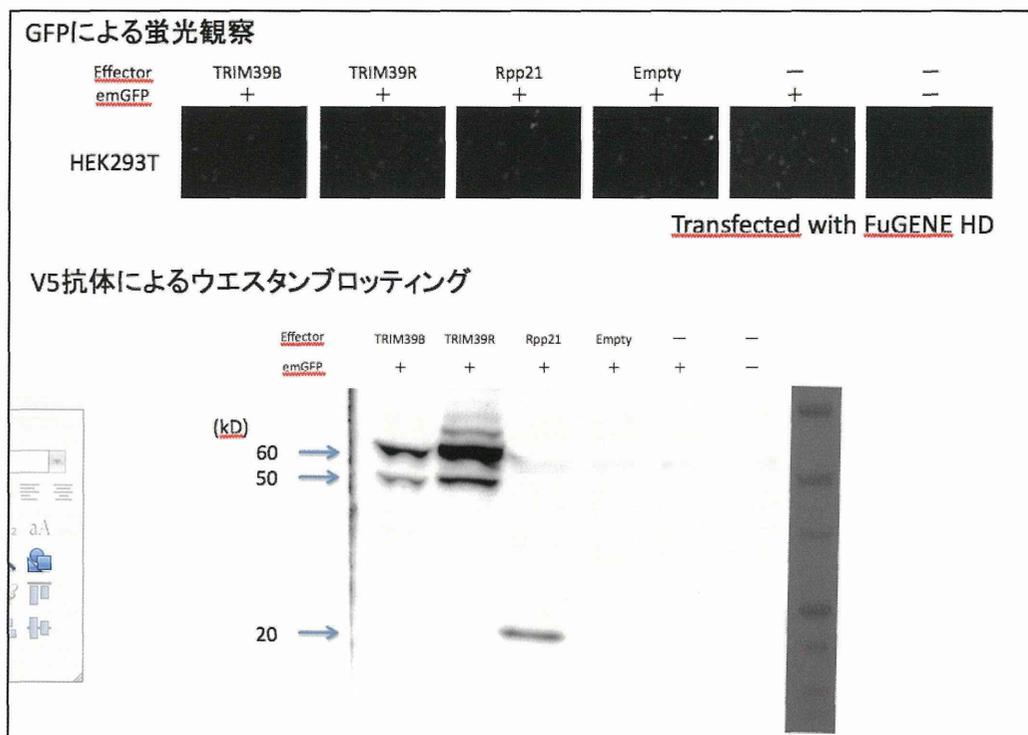


図1. 遺伝子過剰発現細胞を樹立した

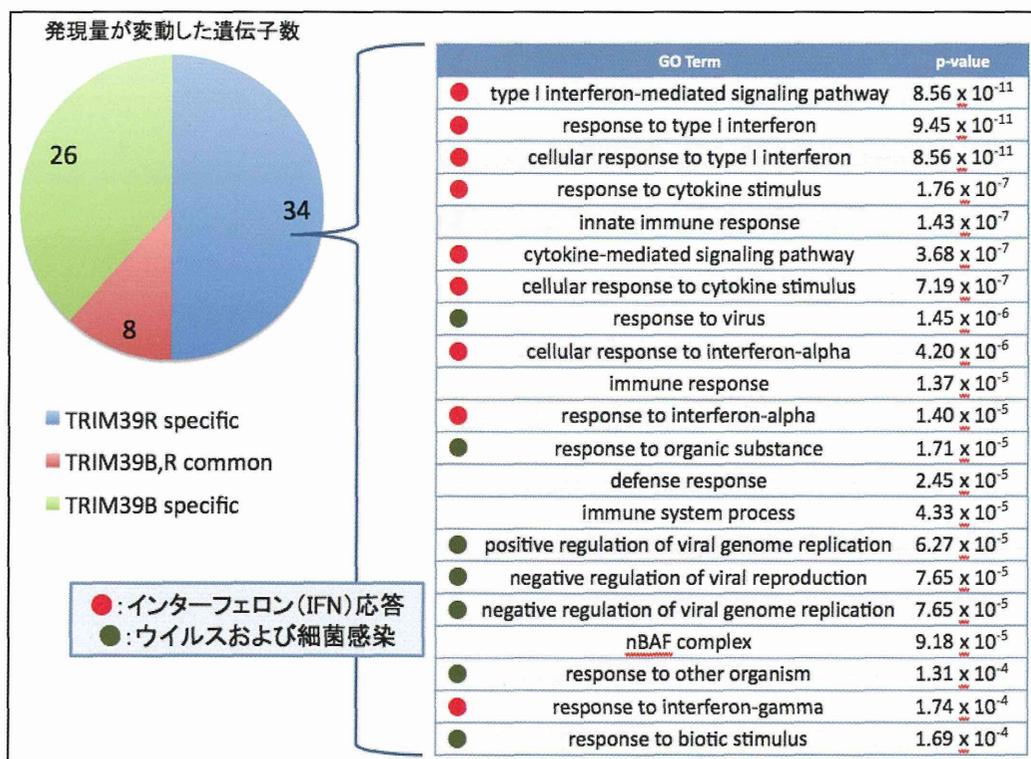


図2. TRIM39R はウイルスや細菌感染および1型 IFN 応答に関与する

厚生労働科学研究補助金
ベーチェット病の自然免疫異常に関する研究

分担研究者 中村晃一郎（埼玉医科大学皮膚科教授）
研究協力者 宮野恭平（埼玉医科大学皮膚科助教）
金子史男（南東北総合病院皮膚免疫アレルギー研究所）

ベーチェット病（B病）の口腔内常在菌に *Streptococcus sanguinis* が存在しており、これらの常在菌に対する過敏反応がベーチェット病に生じると考えられる。B病では針反応に対する過敏反応があり、これらの常在菌に対して過敏反応を示すと考えられる。*Streptococcus sanguinis* を含む自家唾液を用いた皮膚検査では一部に紅斑などの陽性反応を認めた。またサリペットコットン通過唾液でも同様の結果を得た。B病における常在菌に対する過敏反応には、*Streptococcus* 抗原を認識した自然免疫異常、サイトカイン産生異常の関与の可能性が推測された。B病の病態における自然免疫の関与について検索予定である。

A. 研究目的

ベーチェット病（B病）は、口腔内潰瘍、陰部潰瘍、ブドウ膜炎、結節性紅斑、毛嚢炎などの皮膚症状を呈する。本症の発症時に90%以上で口腔内潰瘍が出現する。口腔内潰瘍は日常生活でのQOLを低下させるためこれらの早期診断が必要である。本症B病には自然免疫・獲得免疫の異常があり、これまで *S. sanguinis* が悪化因子として関与することを報告した。B病の補助診断として自家唾液プリックテストが有用である可能性を報告した。

またB病の病態では自然免疫の関与が示されており、*S. sanguinis* によって末梢血の単核球のケモカイン IL-8 産生の誘導が報告されているため、これらの機序を解析する。

B. 研究方法：

小型の prick test 用の lancetter を使用し、B病患者、対象者に関して、自家唾液プリックテスト、サリペットコットン通過唾液でのプリックテストを施行し、48時間後に紅斑の出現について判定し、組織学的変化につい

て検討した。

C. 研究結果

自家唾液反応では、B病患者で約3分の1に小紅斑を認めた。サリペットコットン使用下においてもほぼ同様の結果であった。陽性反応を示した病変部の組織学的所見は、病変部へのマクロファージ浸潤、リンパ球優位の細胞浸潤であった。

D. 考察

B病患者のなかに自家唾液プリックテストで紅斑を生じる症例を認め、サリペットコットン通過唾液でも同様の結果を得た。自家唾液プリックテストの有意性に関しては、針反応の陽性率は30%であり、自家唾液プリックテストではやや高い値を示したものの、今後さらに症例を増やして検討する必要がある。また *S. sanguinis* に対する過敏反応や、自然免疫に対するサイトカイン産生亢進に関してさらに検討を加える予定である。

D. 結論

B病における自家唾液試験は一部で陽性所見を認める結果を得たことから、さらに今後症例の蓄積が有用と思われる。

自然免疫異常の解析において *St. sanguinis* を介しての血球細胞のサイトカイン誘導作用について検索する必要がある。

F.健康危険情報：なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kaneko F, Togashi A, Nomura E, Nakamura K, Isogai E, Yokota K, Oguma K. Role of heat shock protein derived from streptococcus sanguinis in Behcet's disease. J Medical Microbiology &Diagnosis. ISSN: 2161-0703, 2012

Higashi T, Shimojo N, Suzuki S, Nakaya M, Takagi R, Hashimoto K, Nakagome K, Nakamura K, Kohno Y, Matsushita S. Coenzyme A contained in mothers' milk is associated with the potential to induce atopic dermatitis. Int Immunol. 23(12):741-9. 2011.

Togashi A, Saito S, Kaneko F, Nakamura K, Oyama N. Skin prick test with self-saliva in patients with oral aphthoses: a diagnostic pathergy for Behcet's disease and recurrent aphthosis. Inflamm Allergy Drug Targets. 10 (3):164-70, 2011.

Kaneko F, Togashi A, Saito S, Sakuma H, Oyama N, Nakamura K, Yokota K, Oguma K. Behçet's disease (Adamantiades-Behçet's disease). Clin Dev Immunol. 681956. 201

中村晃一郎。粘膜 外陰部・肛囲 Behcet

病の外陰部潰瘍と Lipschuetz 潰瘍の関係は？
皮膚科の臨床、53(11), 1687-1689, 2011,

H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 新生登録状況：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
研究分担報告書

ベーチェット病新規患者の1年後の予後に関連する要因

— 臨床調査個人票を用いて —

研究分担者 黒沢美智子 順天堂大医学部衛生学 准教授
共同研究者 稲葉 裕 実践女子大学生活科学部教授
石ヶ坪良明 横浜市立大学大学院医学研究科病態免疫制御内科学教授
岳野光洋 横浜市立大学大学院医学研究科病態免疫制御内科学准教授

研究要旨

当研究班では医療費の自己負担軽減のための受給申請時に提出されるベーチェット病の臨床調査個人票データを用いた分析結果をH17年度より報告してきた。今回は2004年新規申請者の1年後の悪化の要因を確認することを目的に分析した。臨床調査個人票データは都道府県別に2004年、2005年共に良好に輸入されていたデータを用いた。2004年の新規データ390例と2005年の更新時データを連結させ、申請時の重症度(Stage I～V)が、2005年の更新時に進行していた人を「悪化」とし、多重ロジスティックモデルを用い、「悪化」に影響する要因として2004年申請時の症状(口腔内アフタ、皮膚症状、眼症状、外陰部潰瘍、関節炎、副睾丸炎、消化器病変、中枢神経病変、等)の有無や検査値とし、オッズ比と95%信頼区間を求めた。2004年新規の重症度不明を除く376例のうち、Stage 0は9例(2.4%)、Iは163例(43.4%)、IIは68例(18.1%)、III48例(12.8%)、IV80例(21.3%)、V8例(2.1%)であった。2005年に重症度の変化がなかったのは210例(55.9%)、悪化25例(6.6%)、軽快45例(8.4%)、不明6例(7.9%)、非継続90例(23.7%)であった。ベーチェット病は若年で発症した男性に重症者が多いという特徴を有するが、多変量解析の結果、2004年時の年齢35歳以上に対し、35歳未満のオッズ比は2.38(95%CI: 1.04～5.47)と高かった。主症状については性、年齢を調整した上で分析し、口腔粘膜のアフタ性潰瘍1.97(95%CI:0.25～15.44)、外陰部潰瘍1.58(95%CI:0.62～4.00)のオッズ比が高かったが有意ではなかった。副症状では副睾丸炎(男性のみ)のオッズ比が3.92(95%CI: 0.83～18.60)、性・年齢を調整した分析では潜血または下血有りのオッズ比が1.52(95%CI: 0.52～4.41)、中枢神経病変:麻痺のオッズ比が2.03(95%CI: 0.53～7.77)と高かったが有意ではなかった。今回の分析では年齢以外に1年後の悪化に影響する要因は認められなかった

A. 研究目的

ベーチェット病の臨床疫学像は厚労省研究班で過去5回全国調査が行われ、報告されているが、H15(2001)年より医療費受給申請時に提出される臨床調査個人票データが都道

府県で毎年入力され、厚労省に集積されるシステムが整備されている。ベーチェット病については約10,000例以上のデータが入力され、研究班で分析されるようになり、ベーチェット病の臨床疫学像についての貴重な情報となっ