

ファーマ株式会社

- (2) 名称：超並列高速シーケンサーによる簡便な HLA 遺伝子の DNA タイピング方法及びキット、特許番号：特願 2013-244624、発明者：椎名 隆、鈴木 進悟、尾崎 有紀、光永 滋樹、猪子 英俊、特許権所有者：ジェノダイブファーマ株式会社

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

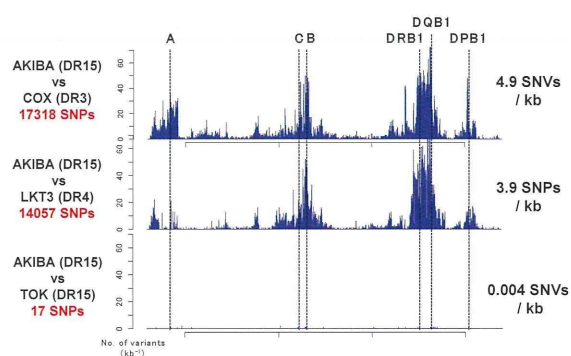


図2. HLA ハプロタイプ間と内におけるゲノム多様性の比較

A 24-B 52-DR 15 と異なる検体由来の A 24-B 52-DR 15 との比較、A 24-B 52-DR 15 と異なる HLA ハプロタイプ間における多様性プロファイルを示す。横軸は各領域（左側からクラス I、クラス III、クラス II の順）を示し、縦軸は 100 塩基あたりの塩基置換数を示した。

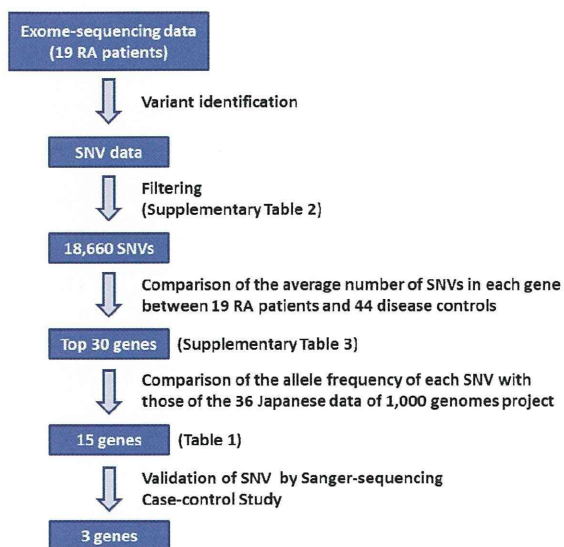


図1. エクソーム解析による RA 候補遺伝子を特定するための過程

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)）  
分担研究報告書

マウス実験的自己免疫性ぶどう膜炎(EAU)モデルの免疫病態解析による  
新規治療標的の探索  
—NKT 細胞を治療標的とした試み—

研究分担者	岩瀬 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
	遠藤 賀子	北里大学医学部免疫学
	北市 伸義	北海道医療大個体差医療科学センター眼科学
	南場 研一・石田 晋	北大院医眼科学分野
	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

我々はヒト視細胞間レチノイド結合タンパク hIRBP 由来ペプチド抗原で C 57 BL/6 マウスを感作することで作製する EAU モデルを用い、NKT 細胞の機能修飾による炎症のコントロールを目指してきた。今回、NKT 2 側に偏倚させる NKT 細胞リガンドの治療的投与を検討したところ、病理組織スコアの軽症化傾向、炎症性サイトカインの産生低下が認められた。この時、所属リンパ節 T 細胞中の抗原特異的 T 細胞を hIRBP<sub>3-13</sub> / I-A<sup>b</sup>-tetramer (NIH Tetramer Facility より供与: 以下、単に tetramer) にて染色し、解析した結果では対照群と有意差はなかった。一方、眼球に浸潤したリンパ球中の抗原特異的 T 細胞の割合を tetramer にて検出すると、NKT 2 偏倚リガンド投与群では tetramer<sup>+</sup> T 細胞の減少傾向が認められた。

A. 研究目的

我々はヒト視細胞間レチノイド結合タンパク hIRBP 由来ペプチド抗原で C 57 BL/6 マウスを感作することで作製する EAU モデルを用い、病態解析と新規治療標的の探索を行って来た。そのうち NKT 細胞の機能修飾による炎症のコントロールを目指して、EAU モデルに対し NKT 細胞リガンドの投与を行った。IFN- $\gamma$  産生能の高い NKT 細胞リガンド (RCAI-56) の予防的 (感作時) 投与では、所属リンパ節 T 細胞の抗原特異的応答における IL-17, IL-22, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  産

生低下を伴って EAU の病理スコアの低下を誘導出来た。しかし、EAU 発症時に RCAI-56 を投与した場合 (治療的投与)、却って病理スコアを悪化させる結果となった。そこで、発症時投与でも EAU を軽症化させることが可能なりガンドを探索し、その奏効メカニズムを明らかにすることを目的に、今回は NKT 2 側に偏倚させるリガンドを含め治療的投与レジメンで比較検討した。また、hIRBP 感作マウスにおけるリンパ球中の抗原特異的 T 細胞の増減を hIRBP<sub>3-13</sub> / I-A<sup>b</sup>-tetramer を用い、リガンドの生物活性発現

の指標の1つとして解析した。

## 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<sup>1-20</sup>:GPTHLFQPSLVLDMAKVLLD) 200 μg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0.2 μgを腹腔内投与することによって誘導した。3週間後、眼球はグルタルアルデヒド前固定/ホルマリン後固定後、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. NKT細胞リガンドの投与：理化学研究所で新しく開発されたNKT1偏倚リガンドRCAI-56(α-carba-GalCer)、プロトタイプリガンドα-GCおよびNKT2偏倚リガンド1化合物をそれぞれ2 μg/匹、対照群はvehicleのみ同量をhIRBP<sub>1-20</sub>感作後9~10日目の症状初発時期に同量を静注した。
3. T細胞のフローサイトメトリー解析：所属リンパ節・脾臓はホモジェナイザーで単一細胞浮遊液にした。眼内浸潤リンパ球は、眼組織をレンズ除去後に細切し、Collagenase Dと37°C 1 hrインキュベートした後に遠心、メッシュを通過させた試料として回収した。T細胞は通常のanti-CD3, -CD4, -CD8抗体(BioLegend)で染色する他、抗原特異的T細胞をIRBP<sub>3-13</sub>/I-A<sup>b</sup>tetramer-PE/anti-CD4-APC/anti-CD3-FITCで染色し、CD3<sup>+</sup>画分についてCD4<sup>+</sup>tetramer<sup>+</sup>として算出した。
4. 抗原特異的T細胞によるサイトカイン産生の評価：hIRBP特異的T細胞応答は感作後21日目の所属リンパ節T細胞画

分をIRBP<sub>1-20</sub>ペプチドと30 Gy X線照射したB6脾細胞をインキュベートし、上清のサイトカイン産生はFlowCytomix(eBiosciences)を用いて定量した。

(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て、許可を得てから実施した(#2013-145)。

## C. 研究結果

NKT2側に偏倚させるNKT細胞リガンドの治療的投与レジメンで投与したところ、EAUスコアの軽症化傾向、IL-5, -2, -17, -22の産生低下が認められた。この時、眼球に浸潤したリンパ球中の抗原特異的T細胞の割合をtetramer染色で調べると、NKT2偏倚リガンド投与群ではtetramer<sup>+</sup>T細胞の減少傾向が認められた。一方、所属リンパ節T細胞中の全CD4<sup>+</sup>T細胞画分および、抗原特異的T細胞をtetramerにて染色、解析した結果では対照群と有意差はなかった。

## D. 考察

EAUで病態に深く関わりと考えられているサイトカイン(IL-17, -22など)がNKT2リガンドの投与によって低下傾向が認められた。EAUの軽症化との関連が推測されるが、このうちIL-22に関しては、ベーチェット病寛解期に高いこと(慶応大 安岡・桑名班員)、マウスEAUの系でIL-22投与により調節性の抗原提示細胞を誘導することで軽症化が生じる(Ke et al. J Immunol 2011; 187: 2130-9)との報告があり、beneficialな作用を有している可能性がある。一方、ベーチェット病患者のTh22に関して必ずしも保護的と考えられない部分もあり(Sugita S et al. JImmunol 2013; 190 (11): 5799-808)、マウスモデルでのIL-22に対する抗体投与や

siRNA による中和・発現抑制実験等も併せて今後検討して行くことが望まれる。

また、これまで増殖反応や産生サイトカインの増減やシフトのみで解析していた hIRBP 特異的 T 細胞の応答を tetramer で直接トラッキング出来るようになった。今後は、NKT 2 リガンドの投与によって抗原特異的 T 細胞の病変部（眼球）や所属リンパ節・脾臓等における動態をより詳細に明らかにする予定である。特に所属リンパ節から眼球へ抗原特異的 T 細胞が移行する際に重要なケモカイン/ケモカイン受容体の発現を解析する。また所属リンパ節において、リガンドによって活性化された NKT 細胞がどのように抗原特異的 T 細胞に作用するのか調べ、奏効メカニズムを明らかにしたい。

#### E. 結論

発症時に使用して、EAU を軽症化することが可能な NKT 2 リガンドを見出した。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし。

#### G. 研究発表

##### 1) 国内

口頭発表	2 件
原著論文による発表	0 件
それ以外（レビュー等）の発表	4 件

##### 論文発表

1. 佐藤 雅, 岩渕和也: 内臓脂肪症候群と NKT 細胞. 小特集 生活習慣病と NKT 細胞-病態モジュレーター的面から. 医学のあゆみ 2013; 246 (3): 215-20.
2. 岩渕和也: NKT 細胞による動脈硬化症と肥満発症機序. 特集 注目される natural killer T (NKT)細胞. 血液フロ

ンティア 2013; 23 (7): 941-8.

##### 学会発表

1. 岩渕和也. マウス実験的ぶどう膜炎 (EAU) における NKT 細胞の役割. 第 102 回日本病理学会総会 (札幌). 2013.6.7.
2. Satoh M, Eshima K, Takeuchi E, Iwabuchi K. Characterization of non-invariant NKT cells in visceral adipose tissue. The 42<sup>nd</sup> Ann Meeting of the JSI 2013. (Chiba). 2013.12.11.
3. Shimano K, Sato M, Okuno H, Gilfillan S, Miyake S, Yamamura T, Ogura H, Iwabuchi K. Atherosclerotic lesion development in MR1/apolipoprotein E-deficient mice. The 42<sup>nd</sup> Ann Meeting of the JSI 2013. (Chiba). 2013.12.11.
4. Okuno H, Sato M, Eshima K, Tamauchi H, Kazuya Iwabuchi K. The role of T cell subsets in the development of nickel-induced allergic contact dermatitis. The 42<sup>nd</sup> Ann Meeting of the JSI 2013. (Chiba). 2013.12.11.

##### 2) 海外

口頭発表	0 件
原著論文による発表	5 件
それ以外（レビュー等）の発表	4 件

##### 論文発表

1. Iwabuchi K, Satoh M. Invariant NKT cell serves as a novel therapeutic target for control of obesity. *ClinLipidol* 2013; 8 (1): 51-4.
2. Andoh Y, Ogura H, Satoh M, Shimano K, Okuno H, Fujii S, Ishimori N, Eshima K, Tamauchi H,

- Otani T, Nakai Y, Van Kaer L, Tsutsui H, Onoé K, Iwabuchi K. Natural killer T cells are required for lipopolysaccharide-mediated enhancement of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Immunobiol* 218(4): 561-9.
3. Homma T, Kinugawa S, Takahashi M, Sobirin MA, Saito A, Fukushima A, Suga T, Takada S, Kadoguchi T, Masaki Y, Furihata T, Taniguchi M, Nakayama T, Ishimori N, Iwabuchi K, Tsutsui H. Activation of invariant natural killer T cells by  $\alpha$ -galactosylceramide ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. *J Mol Cell Cardiol* 62: 179-188, 2013.
  4. Albiero M, Rattazzi M, Menegazzo L, Boscaro E, Cappellari R, Pagnin E, Bertacco E, Poncina N, Dyar K, Ciciliot S, Iwabuchi K, Million R, Arrigoni G, Kraenkel N, Landmesser U, Agostini C, Avogaro A, Fadini GP. Myeloid calcifying cells promote atherosclerotic calcification via paracrine activity and allograft inflammatory factor-1 overexpression. *Basic Res Cardiol* 108: 368, 2013.
  5. Eshima K, Okabe M, Kajiura S, Noma H, Shinohara N, Iwabuchi K. Significant involvement of NF- $\kappa$ B-inducing kinase in proper differentiation of  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T cells. *Immunology* doi: 10.1111/imm.12186, 2013.
  6. Ito S, Iwaki S, Kondo R, Satoh M, Iwabuchi K, Fujii S. TNF- $\alpha$  production in NKT cell hybridoma is regulated by sphingosine-1-phosphate: implications for atherosclerosis. *Coron Artery Dis* (in press) 学会発表
1. Satoh M, Namba K-I, Kitaichi N, Taniguchi M, 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 uveo-retinitis in mice. 6<sup>th</sup> Intl Workshop Kyoto T Cell Conf (Kyoto). 2013. 6. 5.
  2. Iwabuchi K, Sato M, Eshima K, Gilfillan S, Miyake S, Yamamura T, Onoe K, Ogura H. Development of atherosclerotic lesion is aggravated in MR1<sup>-/-</sup> mice - an ameliorating role of MR1-restricted NKT cells in atherosclerosis- The 7<sup>th</sup> Intl Symposium on CD1/NKT cells. (Tours, France). 2013. 9. 14.
  3. Satoh M, Eshima K, Takeuchi E, Iwabuchi K. Characterization of non-invariant NKT cells in visceral adipose tissue. The 7<sup>th</sup> Intl. Symposium on CD1/NKT cells. (Tours, France). 2013. 9. 14.
- 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

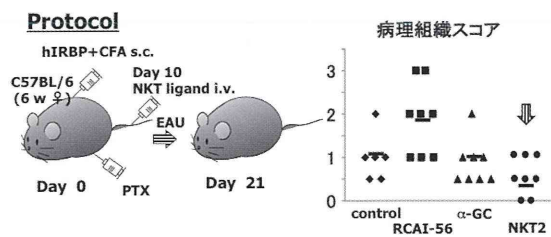


図1. 治療的投与レジメンによる EAU の病理組織スコア

NKT 2 偏倚リガンドを感作後 9~10 日に投与すると, 病理組織スコアが低下する傾向にあった (↓)。RCAI-56 では逆に増強していた。

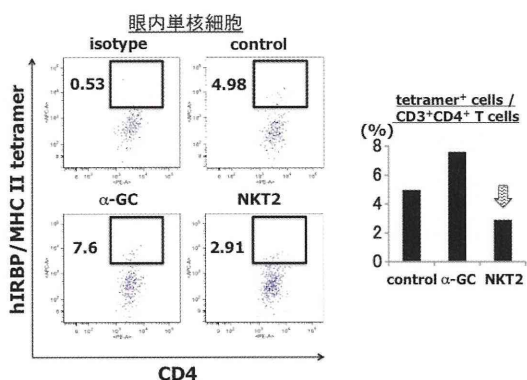


図2. hIRBP<sub>3-13</sub>/I-A<sup>b</sup>tetramer 染色による眼内 CD 4<sup>+</sup> T 細胞中の tetramer<sup>+</sup> T 細胞  
左パネル: FACS プロファイル; 右グラフ: tetramer<sup>+</sup> T 細胞の割合。NKT 2 リガンド投与で減少していた (↓)。

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)）  
分担研究報告書

「ベーチェット病 CD 4+T 細胞分化における IL-12 ファミリーサイトカインの関与」

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

研究要旨

われわれはベーチェット病 (BD)における Th 1 と Th 17 の関連について検討し、末梢血ナイーブ CD 4+T 細胞の刺激・培養試験では、IL-12 の存在下にて IFN  $\gamma$ 、IL-23 の存在下にて IL-17 の mRNA が BD において健常人に比し有意な発現亢進が見られることを発見した。近年 IL-12、IL-23、IL-27、IL-35 は、それぞれの受容体および細胞シグナルに多くの共有部分が存在することより IL-12 ファミリーと称されるようになってきている。CD 4+T 細胞機能をこの概念により解析した。その結果、IL-12 ファミリーサイトカイン添加培養下で、BD の CD 4+T 細胞の Th 17 細胞分化の高頻度が確認され、同時に Th 17 細胞分化のマスター遺伝子 RORC の亢進が見られた。また、採取直後の末梢血 Th 17 細胞頻度と IL-23 受容体陽性細胞頻度に正相関がみられたが、培養後には消失した。BD では IL-23/IL-23 受容体の相互作用が Th 17 細胞の増加に関与しているものと考えられるが、同時に IL-12 ファミリーサイトカインがすべて同時に BD の CD 4+T 細胞分化に影響を及ぼしている可能性も示された。

A. 研究目的

われわれは昨年の本会議において、ベーチェット病 (BD) の病態における Th 17 型イフェクター T 細胞の増加と、その増加に IL-23 による過剰刺激が関与する可能性があることを報告した。近年 IL-12、IL-23、IL-27、IL-35 の 4 サイトカインは、それぞれの受容体および細胞シグナルに多くの共有部分が存在することより IL-12 ファミリーと称されるようになってきている。このファミリーの T 細胞分化に与える影響は、炎症惹起から抑制まで多岐にわたることも徐々に明らかになってきた。そこで本年は、このサイトカインファミリーによる CD 4+T 細胞分化制御を試みたので報告する。

B. 研究方法

患者(n=6)および健常人(n=7)よりメモリー

CD 4+T 細胞を採取。IL-12、IL-23、IL-35、抗 IL-23 抗体(p 19)および JAK 阻害剤の存在下で培養し、IL-23 受容体発現量、IFN  $\gamma$  および IL-17 の産生量をフローサイトメーターで観察。

さらに同細胞における Th 17 関連遺伝子 (IFN  $\gamma$ 、IL-17、IL-23 受容体、RORC、Smad 2) 発現を、リアルタイム PCR で観察した。

統計処理は Wilcoxon 検定を用い、 $p < 0.05$  で有意とした。

(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ている。

### C. 研究結果

細胞内サイトカイン産生に関しては健常人に比較し BD において、IL-12 ファミリーサイトカインそれぞれの刺激で Th 17 細胞頻度は上昇傾向にあったが、IL-23 および抗 IL-23 抗体の存在下で有意差を持った。一方、Th 1 細胞は IL-23、IL-35、抗 IL-23 抗体、JAK 阻害剤の存在で BD において有意に減少した。また、Th 17 細胞由来で高い病原性を持つとされる IFN  $\gamma$  産生 Th 17 細胞頻度は、採取直後は BD で高い傾向にあったが (P=0.054)、培養後は IL-12 および IL-35 の存在で逆に減少した。Th 17 細胞頻度と IL-23 受容体陽性細胞頻度の間には強い直線相関が BD 群でのみ観察されたが、Th 1 細胞には相関は見られなかった。

遺伝子発現では、RORC が BD において IL-12 ファミリーサイトカインの存在下全般で高値傾向にあったが、抗 IL-23 抗体にて有意に上昇していた。その他の結果も省みて、この抗体は刺激性に働いているものと考えた。

### D. 考察

IL-12 ファミリーサイトカインによる刺激培養試験によって、ある程度まで BD の CD 4+T 細胞異常をビトロで再現できているものとする。また BD における Th 17 細胞増加は、IL-23 受容体の増加によるものと推察された。

### E. 結論

BD では IL-23/IL-23 受容体の相互作用が Th 17 細胞の増加に関与しているものと考えられる。

### F. 健康危険情報

特記事項なし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Shimizu J, Kaneko F, Suzuki N. Skewed helper T cell responses to IL-12 family cytokines produced by antigen presenting cells and the genetic background in Behcet's Disease. Genetics Res Int 2013 In press.

#### 2. 学会発表

清水 潤、鈴木 登 ベーチェット病リンパ球における Th 17 細胞関連サイトカインと IL-23 受容体の動態 第 57 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（難治性疾患等克服研究事業(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 Th 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リウマチ内科  
研究協力者 安岡 秀剛 慶應義塾大学医学部リウマチ内科  
竹内 勤 慶應義塾大学医学部リウマチ内科

研究要旨

Th 22 は最近報告された IL-22 産生を特徴とする T 細胞サブセットで、IL-17 産生がない点が Th 17 と異なる。IL-22 は生体内では抗菌タンパクの産生やプロテアーゼ産生を介し組織障害からの保護する役割を持つことから、過剰な炎症性病態の抑制と関連する。そこで、昨年度は血漿 IL-22 濃度に着目し、非活動期 BD で活動期 BD や健常人に比べて高値で、非活動期に Th 22 への偏倚が示唆された。そこで本年度は上記の仮説をさらに検証するため、末梢血ヘルパー T 細胞中の Th 22 の比率の変化と疾患活動性の関連、および特に IL-22 により発現が誘導される抗菌タンパク lipocalin-2 と血漿 IL-22 の関連について検討した。対象は BD 23 例（活動期 12 例、非活動期 11 例）、健常人 13 例。末梢血 Th 22 サブセットの比率は非活動期 BD で健常人あるいは活動期 BD と比較し有意に増加していた(それぞれ  $P < 0.05$ )。また、BD の治療前後で経過を観察しえた 4 例では治療後に Th 22 の比率が上昇していた。血漿 lipocalin-2 濃度は非活動期例で血漿 IL-22 濃度と正に相関していた。以上より BD の非活動期には Th 22 の比率が増加し、BD の非活動性と関連する可能性が示唆された。

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<sup>+</sup>T 細胞について多く検討が行われ、CD 4<sup>+</sup>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。これまで我々は 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、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 サブセットの存在が報告された。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、 $\beta$ -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。昨年度は、Th 22 の BD の病態における役割を追究するため、Th 22 が産生する IL-22 に着目し、Th 17 が産生する IL-17 と比較検討した。その結果、BD 患者の血漿 IL-22 濃度は活動期 BD で健常人および非活動期 BD と比べ低値で、活動期に

は IL-17 と IL-22 濃度が正の相関、非活動期には負の相関の傾向を示していたことから、非活動期には Th 22 の比率が増加している可能性が示唆された。そこで本年は末梢血ヘルパー T 細胞中の Th 22 の比率と疾患活動性の関連、および特に IL-22 により発現が誘導される抗菌タンパクと IL-22 の関連について検討した。

## 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 lipocalin-2 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 lipocalin-2 濃度の測定は ELISA (R&D systems) を用いた。

3. 末梢血 CD 4<sup>+</sup>T 細胞中の Th 22 の検出  
ケモカインレセプターの発現により Th 22 を CD4<sup>+</sup>CCR 6<sup>+</sup>CCR 10<sup>+</sup>細胞と定義し、FITC 標識抗 CD 4 抗体(Beckman Coulter)、APC 標識抗 CCR 6 抗体 (BD pharmingen)、PE 標識抗 CCR 10 抗体(R&D systems)を用いて末梢血 CD 4<sup>+</sup>T 細胞中の Th 22 の比率についてフローサイトメトリーで検討した。

4. 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

Th 22 の比率は、非活動期 BD で活動期 BD、健常人と比較し、それぞれ高値であった (非活動期 BD  $3.0 \pm 1.0$  %, 活動期 BD  $0.9 \pm 0.4$  %, 健常人  $1.5 \pm 0.5$  %, それぞれ  $P < 0.05$ )。また BD の眼病変に対し治療を行い、症状が軽快した 4 例全例で、疾患活動性の低下に伴い、Th 22 の比率は上昇していた。

さらに IL-22 により発現が誘導される lipocalin-2 の血漿中濃度を検討したところ、活動期および非活動期 BD のいずれも健常人より高値であった (活動期 BD  $1.0 \pm 0.7$  ng/ml、非活動期 BD  $1.1 \pm 0.9$  ng/ml、健常人  $0.4 \pm 0.2$  ng/ml、それぞれ  $P < 0.05$ ) が、非活動期では活動期と比較し、統計学的有意差はなかった。さらに活動期および非活動期に層別化し、血漿 IL-22 濃度と lipocalin-2 濃度の相関を検討すると、活動期では相関を認めなかったのに対し、非活動期では正の相関を認めた ( $x$ : IL-22,  $y$ : lipocalin-2 とし、相関曲線  $y = 0.13x + 0.67$ ,  $R = 0.61$ ,  $P < 0.05$ )。

## D. 考察

これまでの検討で、BD 患者末梢血中では健常人と比較し、活動期に血漿 IL-22 濃度が低値、IL-17 濃度が高値で、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すると、活動期には正、非活動期には負の相関の傾向を示していた。Th 17 は IL-17 と IL-22 の両方を産生し、Th 22 は IL-22 を産生するが IL-17 は産生しないことから、活動期には Th 17 が優位に、非活動期には Th 22 が優位となっている可能性が考えられた。そこで今回我々はケモカインレセプターの発現をもとに末梢血 CD 4<sup>+</sup>T 細胞中の Th 22 の比率について検討した。その結果、IL-22 の

検討から推測された結果と同様、Th 22 の比率は非活動期 BD で活動期 BD・健常人と比較し高値で、相対的に非活動期に Th 22 が優位であった。また Th 22 から産生される IL-22 により発現が誘導される lipocalin-2 の血漿濃度は BD 患者では活動性に関わらず健常人より高値であった。血漿 IL-22 濃度との相関をみると、活動期に関連がみられなかったのに対し、非活動期に正の相関を示していた。これらの結果より、非活動期では lipocalin 産生が Th 22 に依存している可能性が示唆された。IL-22 を産生する細胞群としては NK 細胞など Th 17/Th 22 以外のリンパ球サブセットが存在することから、今後 IL-22 のソースとなる細胞についてさらなる検討が必要と考えられた。

#### E. 結論

ベーチェット病において Th 22 がベーチェット病の非活動性と関連する可能性がある。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし。

#### G. 研究発表

##### 1) 国内

口頭発表 1 件

原著論文による発表 0 件

それ以外（レビュー等）の発表 0 件

#### 論文発表

なし

#### 学会発表

1. 岳野光洋、出口治子、須田昭子、渡邊玲光、桑名正隆、沢田哲治、菊地弘敏、永渕裕子、廣畑俊成、石ヶ坪良明: 血管ベーチェット病診療ガイドライン作成に向け

て.第 57 回日本リウマチ学会総会(京都). 2013. 4. (ワークショップ 14: ベーチェット病)

##### 2) 海外

口頭発表 2 件

原著論文による発表 0 件

それ以外（レビュー等）の発表 0 件

#### 論文発表

なし

#### 学会発表

1. Takeno M, Ideguchi H, Suda A, Watanabe R, Kikuchi H, Nagafuchi H, Kuwana M, Saito K, Hirohata S, Ishigatsubo Y: Clinical features of Japanese patients with vasculo- Behçet's disease: a multicenter study by Behçet's disease reseach committee, MHLW. The European League Against Rheumatism 2013 (Madrid). 2013. 6.
2. Hirohata S, Kikuchi H, Sawada T, Nagafuchi H, Kuwana M, Takeno M, Ishigatsubo Y: Colchicine reduces relapse of acute neurological attacks in Behçet's disease. The European League Against Rheumatism 2013 (Madrid). 2013. 6.

#### 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

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%)

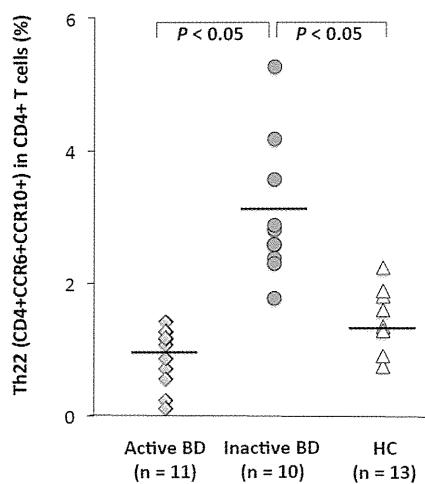


図 1. ベーチェット病(BD)および健常人(HC)における末梢血 CD 4<sup>+</sup>T 細胞中の Th 22 の比率.

厚生労働科学研究補助金（難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患克服研究事業)）  
ベーチェット病における自然免疫の関与に関する研究

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）

ベーチェット病の病態は不明であるが、遺伝子背景や環境因子の関与が示唆されている。ベーチェット病は口腔内アフタで発症することが多く、口腔内唾液中に *S. sanguinis* などの口腔内常在菌の増加が認められていることから、これらの菌体成分がその発症に関与する可能性が推測される。われわれは自己唾液中に含まれている *S. Sanguinis* の関与を明らかにするために自家唾液によるプリックテストを行い、その結果、一部の症例で 24 時間後に紅斑や膿疱の出現することを報告してきた。また、*in vitro* で *S.sanguinis* 菌体成分由来のペプチドが皮膚樹状細胞に対して、IL-23 などのサイトカイン産生を亢進することを示した。ベーチェット病患者の口腔内唾液中の *S. sanguinis* などの細菌叢はベーチェット病の発症や増悪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（B 病）は口腔内アフタ性潰瘍、結節性紅斑などの皮膚症状、眼症状、消化器症状などの全身症状を合併する疾患である。これまで B 病の患者の口腔内細菌叢には *S. sanguinis* が存在し、病態に関与することを報告している。自家唾液に対するプリック反応の有用性の可能性を報告し、48 時間反応で、B 病で紅斑などの反応を示す症例が認められた。

B 病の発症、増悪には自然免疫や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 病の病態においてサイトカイン産生から見た *S. sanguinis* の関与について検討した。

#### B. 研究方法

樹状細胞を作成し培養した。その培養に PGN などの刺激下にサイトカイン産生能を検討した。さらに *S. sanguinis* の菌体成分を加えてその反応を検討した。

#### C. 研究結果

自己唾液を用いたプリックテストでは陽性反応を示す症例があるものの、同時に反応の陰性を示す症例が認められた。

また採取し培養した樹状細胞は CD 1 a 陽性,HLADR 陽性であった。これらの細胞は *in vitro* で PGN 刺激下に IL-23 産生能が亢進した。さらに *S. sanguinis* 刺激下で IL-23 産生は亢進した。

#### D. 考察

皮膚に在住する樹状細胞が、皮膚や粘膜において *S. sanguinis* などの外来抗原に反応することが、樹状細胞のサイトカイン産生の変化から示された。樹状細胞は自然免疫に関与すると同時に、口腔内唾液中の菌体成分にも反応し、Th 1 細胞や TH 17 細胞などの獲得免疫にも反応している可能性が示された。樹状細胞の MHC 拘束性と自己唾液の抗原に関しても対応が存在するかどうかについて今後解析を進める必要があると考えられた。

## E. 結論

B病における免疫異常に唾液由来の *S. sanguinis* の菌体成分の関与の可能性が示された。

## 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

### 2. 学会発表

金子史男、富樫亜吏、野村絵里香、中村晃一郎。ベーチェット病の補助診断としての自家唾液によるプリック反応。第63回日本アレルギー学会秋季学術大会。2013, 11月

## 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 2004～08年(5年間)新規申請者の1年後の予後に関連する要因  
－ 臨床調査個人票データを用いて －

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 順天堂大医学部衛生学名誉教授  
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年度より報告している。今年度は2004～2008年(5年分)の臨床調査個人票データを用いて、1年後の悪化要因を分析した。都道府県別に2004年～2009年まで良好に入力されている臨床調査個人票データを用いて、2004～08年の各年の新規データと1年後の更新データを連結させ、1794例を分析に用いた。新規申請時の重症度(Stage I～V)が1年後の更新時に進行していた人を「悪化」とし、「悪化」に影響する要因を新規申請時の症状(口腔内アフタ、皮膚症状、眼症状、外陰部潰瘍、副睾丸炎、消化器病変、血管病変、中枢神経病変、等)や病型、検査所見(皮膚の針反応、炎症反応、等)とし、多重ロジスティックモデルを用いてオッズ比と95%信頼区間を求めた。その結果、1年後の悪化に影響していたのは新規申請時の「潜血・下血の症状あり」オッズ比1.66(95%信頼区間1.03～2.67)と「皮膚の針反応あり」オッズ比1.66(95%信頼区間1.01～2.73)であった。それ以外の要因は1年後の悪化に有意な関連を認めなかった。

A. 研究目的

ベーチェット病の臨床疫学像についての調査は厚労省研究班で過去5回の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ている。

これまで当研究班では特殊型ベーチェットの有病割合、Stage分布(H17年度報告)<sup>1)</sup>、

ベーチェット病の予後の検討：重症度の変化(H18年度報告)<sup>2)</sup>、ベーチェット病の主症状出現パターンと特殊型ベーチェットの分布(H20年度報告)<sup>3)</sup>、特殊型ベーチェット(腸管型、血管型、神経型)の臨床疫学像(H21年度報告)<sup>4)</sup>、発症(推定)からの経過年数別にみたベーチェット病の臨床疫学像(H22年度報告)<sup>5)</sup>と、分析を進めてきた。臨床調査個人票データは受給者が更新した場合、個人ベースで経過を確認することができるが、本システムが開始して約9年経過し、ようやく一昨年度より累積データを用いた予後の検討を開始した。H23年度は2004年の新規受給者の

1年後、5年後の病型と重症度(Stage)の変化を確認<sup>6)</sup>した。ベーチェット病の重症度はStage 0～Vに分類されており、Stage Iは眼症状以外の症状があるもの、Stage IIはStage Iに眼症状(虹彩毛様体炎)や関節炎や副睪丸炎が加わったもの、Stage IIIは眼症状(網脈絡膜炎)があるもの、Stage IVは失明の可能性がある眼合併症、重度の後遺症を有す特殊病型、Stage Vは生命予後に危険のある特殊病型、進行性神経ベーチェット病とされ、Vが最も重症である。昨年度は2004年新規申請者の1年後のStage悪化の要因を分析したが、例数が390例と少なく、悪化要因は若年発症(35歳)以外に認められなかった<sup>7)</sup>。そこで今年度は2004～2008年(5年分)の新規臨床調査個人票データを用いて、1年後の悪化の要因を確認することを目的に分析を行った。

## B. 研究方法

臨床調査個人票データは厚労省に利用申請を行い、一定の手続きを経て入手した。

都道府県別に2004年～2009年まで良好に入力されている臨床調査個人票データを用いた。2004～08年の各年の新規データを1年後の更新データと連結させ、申請時の重症度(Stage I～V)が、1年後に進行していた人を「悪化」とした。分析は多重ロジスティックモデルを用い、結果変数を「悪化」とし、リスク因子として新規申請時の症状(口腔内アフタ、皮膚症状、眼症状、外陰部潰瘍、副睪丸炎、消化器病変、血管病変、中枢神経病変、等)、病型、検査所見(皮膚の針反応、炎症反応、等)とし、性・年齢を調整した上でオッズ比を求めた。

(倫理面への配慮)

臨床調査個人票は全て匿名化されており、研究班の分担研究者が個人を特定することは

できない。

## C. 研究結果と D. 考察

表1に2004～2008年新規申請者の1年後のStage(重症度)の変化を示す。2004～2009年まで良好に入力されていた都道府県データと1年後の更新データを連結させると1880例であった。新規申請者の重症度(Stage)分布は0が16例、Iが725例、IIが434例、IIIが233例、IVが325例、Vが42例、Stage不明が86例であった。新規のStage(重症度)が不明だった86例を除く1794例の内、1年後にStageの変化がなかったのは964例(53.7%)、軽快していたのは185例(10.3%)、悪化していたのは106例(5.9%)、非継続が(26.4%)であった。

表2に多重ロジスティックモデルによる2004年～2008年ベーチェット病新規申請者の1年後の悪化に影響する要因を示す。病型、症状(副睪丸炎を除く)、検査所見の分析は性・年齢を調整した。その結果、新規申請時の「潜血・下血の症状あり」のオッズ比1.66(95%信頼区間1.03～2.67)と「皮膚の針反応あり」のオッズ比1.66(95%信頼区間1.01～2.73)が有意に高かった。それ以外の要因は1年後の悪化に有意な関連を認めなかった。ベーチェット病新規申請者の1年後の悪化に影響する要因は「潜血・下血」と「針反応あり」であった。

## 結論

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て2004～2008年新規申請者1794例の1年後の悪化の要因を分析した。

新規申請時の重症度(Stage I～V)が、1年後の更新時に進行していた人を「悪化」とし、「悪化」に影響する要因として新規申請時の



症状(口腔内アフタ、皮膚症状、眼症状、外陰部潰瘍、副睾丸炎、消化器病変、血管病変、中枢神経病変、等)や病型、検査所見(皮膚の針反応、炎症反応、等)とし、多重ロジスティックモデルを用い、オッズ比と95%信頼区間を求めた。その結果、新規申請時の「潜血・下血の症状あり」オッズ比1.66(95%信頼区間1.03~2.67)と「皮膚の針反応あり」オッズ比1.66(95%信頼区間1.01~2.73)が有意に高かった。それ以外の要因は1年後の悪化に有意な関連を認めなかった。

#### 参考文献

1. ベーチェット病のH13-16年度臨床調査個人票電子化データの分析. 稲葉 裕、黒沢美智子、金子史男、永井正規.厚生労働科学研究費補助金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17年度総括・分担研究報告書: p 78-81.
  2. ベーチェット病の予後の検討:重症度の変化. 稲葉 裕、黒沢美智子、金子史男、永井正規.厚生労働科学研究費補助金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18年度総括・分担研究報告書: p 97-100.
  3. ベーチェット病の主症状出現パターンと特殊型ベーチェットの分布. 黒沢美智子、稲葉 裕、石ヶ坪良明、永井正規. 厚生労働科学研究費補助金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20年度総括・分担研究報告書: p 60-62.
  4. 特殊型ベーチェット(腸管型、血管型、神経型)の臨床疫学像. 黒沢美智子、稲葉 裕、石ヶ坪良明、岳野光洋、永井正規.厚生労働科学研究費補助金 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21年度総括・分担研究報告書: p 60-65.
  5. 発症(推定)からの経過年数別にみたベーチェット病の臨床疫学像. 黒沢美智子、稲葉 裕、石ヶ坪良明、岳野光洋、永井正規.厚生労働科学研究費補助金 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22年度総括・分担研究報告書:p 54-55.
  6. ベーチェット病の新規受給者の1年後、5年後の予後- 臨床調査個人票データを用いて. 黒沢美智子、稲葉 裕、石ヶ坪良明、岳野光洋. 厚生労働科学研究費補助金 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23年度総括・分担研究報告:p 56-60.
  7. 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.黒沢美智子、稲葉 裕、石ヶ坪良明、岳野光洋. 厚生労働科学研究費補助金 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24年度総括・分担研究報告:p 53-59.
- E. 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  
なし
- 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

表1 2004～08年新規申請者の1年後のStage(重症度)の変化

			1年後の Stage 分布								
			0	I	II	III	IV	V	不明	非継続	
2004～ 2008年 新規 1880例	0	35	⇒	16	6	0	0	0	0	4	9
	I	725	⇒	17	437	32	4	23	1	19	192
	II	434	⇒	13	64	205	10	13	0	19	110
	III	233	⇒	6	8	13	128	11	1	10	56
	IV	325	⇒	13	24	7	6	164	5	13	93
	V	42	⇒	0	5	0	0	9	14	0	14
	不明	86	⇒	5	23	13	4	6	1	4	30

青い部分は「変化なし」、黄色は「軽快」、グレーは「悪化」

表2 多重ロジスティックモデルによる2004年～2008年ベーチェット病新規申請者の1年後の悪化に影響する要因

変数		Odds ratio	95%CI	p値
性	男性	1.26	0.86 - 1.85	NS
発症年齢	35歳未満	1.33	0.86 - 2.04	NS
病型	完全型	1.00	—	—
	不全型	1.11	0.65 - 1.90	—
	特殊型	1.21	0.58 - 2.18	NS
症状	口腔粘膜のアフタ性潰瘍あり	0.66	0.34 - 1.28	NS
	皮膚症状-結節性紅斑様皮疹あり	1.18	0.79 - 1.78	NS
	眼症状-虹彩毛様体炎あり	1.03	0.66 - 1.61	NS
	眼症状-網膜ぶどう膜炎あり	0.97	0.62 - 1.52	NS
	外陰部潰瘍あり	1.39	0.90 - 2.13	NS
	副睾丸炎あり(男性のみ)	1.25	0.50 - 3.12	NS
	消化器病変-腹痛あり	1.24	0.80 - 1.90	NS
	消化器病変-潜血下血あり	1.66	1.03 - 2.67	<0.05
	血管病変-血管障害あり	1.78	0.92 - 3.45	NS
	中枢神経病変:麻痺あり	1.32	0.55 - 3.16	NS
	中枢神経病変:精神症状あり	1.63	0.72 - 3.71	NS
検査所見	皮膚の針反応あり	1.66	1.01 - 2.73	<0.05
	血清CRPの陽性化(>1.0)	1.37	0.86 - 2.16	NS
	補体価の上昇(>40単位)	1.63	0.87 - 3.08	NS

病型、症状、検査所見は性・年齢を調整。

厚生労働研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患克服研究事業)）  
分担研究報告書

ベーチェット病における眼炎症発作とインフリキシマブトラフ値、  
サイトカイン血中濃度との相関および抗インフリキシマブ抗体と投与時反応の関連について

大野 重昭	北海道大学大学院医学研究科炎症眼科学講座
南場 研一	北海道大学大学院医学研究科眼科学分野
北市 伸義	北海道医療大学眼科
竹本 裕子	北海道大学大学院医学研究科眼科学分野
水内 一臣	北海道大学大学院医学研究科眼科学分野
宇野 友絵	北海道大学大学院医学研究科眼科学分野
田川 義晃	北海道大学大学院医学研究科眼科学分野

研究要旨

[目的] 難治性ぶどう膜炎を伴うベーチェット病に対するインフリキシマブ（IFX）治療は高い有効性を示す一方、IFX に抵抗性を示し視力を失っていく症例もみられる。今回我々は IFX 有効性と IFX トラフ値（薬剤反復投与中の投与直前の血中濃度）、IFX 抗体との関連性および IFX 抗体と投与時反応について検討した。

[方法] 北海道大学病院で IFX 治療中のベーチェット病患者のうち、IFX 投与前から継続して採血を施行した 27 例について、IFX トラフ値およびサイトカインの血中濃度を測定した。また、IFX トラフ値が検出域以下となった際には抗 IFX 抗体を検査した。

[結果] IFX 導入前の TNF- $\alpha$  濃度は全例で 2.5 pg/ml 以下であり、眼炎症発作の有る群で高い傾向がみられた。IFX トラフ値は眼炎症発作前後に有意に低いという結果が得られた。IL-1 $\beta$ 、IL-6 は眼炎症発作の前後で高値となる傾向にあったが有意差まではみられなかった。抗 IFX 抗体は測定可能であった 7 例中 3 例で陽性であり、陽性例では眼発作あるいは投与時反応が頻発してみられるものがあった。IFX 抗体陽性の 3 例中 2 例（67%）に投与時反応が生じているのに対し、陰性の 29 例では 1 例（3%）にしか生じていなかった。

[まとめ] IFX 治療中のベーチェット病での眼炎症発作は、IFX トラフ値が低いと生じやすかった。眼炎症発作と IL-1 $\beta$ 、IL-6 などのサイトカインが関与する可能性が示唆された。また、抗 IFX 抗体は投与時反応あるいは眼炎症発作と関連している可能性がある。

A. 研究目的

難治性ぶどう膜炎を伴うベーチェット病に対するインフリキシマブ（IFX）治療は高い有効性を示し、ベーチェット病の視力予後の改善に大きく寄与している。しかし一方、IFX に抵抗性を示し視力を失っていく症例

がいるのも事実である。今回我々は IFX 有効性と IFX トラフ値（薬剤反復投与中の投与直前の血中濃度）、サイトカイン濃度、IFX 抗体との関連性および IFX 抗体と投与時反応について検討した。

## B. 研究方法

対象は北海道大学病院で IFX 治療中のベーチェット病に伴う難治性ぶどう膜炎患者のうち、IFX 投与前から継続して採血を施行した 27 例である。IFX トラフ値（薬剤反復投与中の投与直前の血中濃度）およびサイトカインの血中濃度を定期的に測定した。また、IFX トラフ値が検出域以下となった際には抗 IFX 抗体（ATI）の有無も検査した。

## C. 研究結果

IFX 導入前の TNF- $\alpha$  濃度は全例で 2.5 pg/ml 以下であり、その後の眼炎症発作の有無と相関はみられなかった。IFX トラフ値は眼炎症発作前後に有意に低いという結果が得られた。 $\chi^2$  検定値が最も高くなる IFX トラフ値のカットオフ値は  $0.8 \mu\text{g/ml}$  であり、そのときの p 値は 0.005 未満であった（図 1）。

IL-1 $\beta$ 、IL-6 は眼炎症発作の前後で高値となる傾向にあったが有意差まではみられなかった。多くの症例は IFX が著効し ATI の出現はみられなかったが、中には ATI の出現とともに IFX の有効性が低下している例もみられ、その症例では眼発作が頻発してみられた（図 2）。

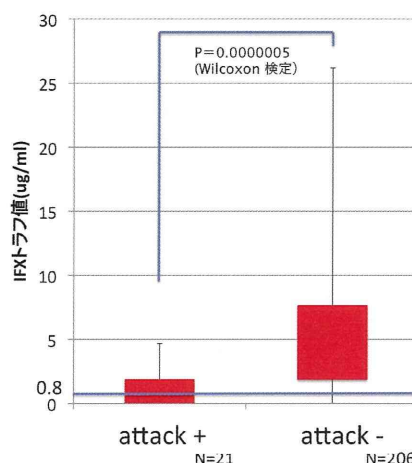


図 1 眼発作の有無と IFX トラフ値

眼炎症発作が生じる症例では IFX トラフ値が低い



図 2 ATI 陽性 IFX 無効型

経過中に IFX トラフ値が 0 となり、途中から ATI が検出された症例。眼炎症発作が頻発している。

抗 IFX 抗体は測定可能であった 7 例中 3 例で陽性であり、陽性例では眼発作あるいは投与時反応が頻発してみられるものがあつた（図 3）。

IFX 抗体陽性の 3 例中 2 例（67%）に投与時反応が生じているのに対し、陰性 29 例では 1 例（3%）にしか生じていなかった。