

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591443

研究課題名(和文) ベーチェット病をモデルとしたHO-1による自己炎症・自己免疫の制御

研究課題名(英文) Regulatory roles of heme oxygenase-1 in autoinflammation and autoimmunity as a model of Behcet's disease

研究代表者

岳野 光洋 (Takeno, Mitsuhiro)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：50236494

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では「IL-10/HO-1炎症制御系の破綻が自己免疫および自己炎症を介してベーチェット病(BD)病態を形成する」という仮説の検証を目的とした。GWAS後、CCR1、STAT4、KLRC4、ERAP1、TLR4、NOD2、MEFVなど獲得免疫、自然免疫に関わる疾患感受性遺伝子を同定した。この中でTLR4は先行研究のHO-1発現低下機序に寄与しており、仮説の一部が検証された。さらに、HO-1は非古典的なM2マクロファージに選択的に発現することから、M1/M2バランスにおけるM1の相対的活性化がBD病態を形成する可能性が高く、今後、継続検討(課題番号26461469)予定である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we try to verify the hypothesis that impaired protective function by IL-10/HO-1 trigger autoimmune and autoinflammatory responses, leading to Behcet disease (BD). Further analyses after GWAS have identified CCR1, STAT4, KLRC4, ERAP1, TLR4, NOD2, and MEFV as susceptible genes, all of which are involved in the acquired and innate immunity systems. Of them, genetic contribution of TLR4 is concordant with our previous finding that overexpression of TLR4 is associated with defective expression of HO-1 in BD patients, suggesting validity of the hypothesis in part. Moreover, recent studies have shown that HO-1 is preferentially expressed on non-classical M2 macrophages, suggesting M1 deviation of M1/M2 balance is responsible for development of BD. The issue will be studied in the next grant (No. 26461469).

研究分野：医歯薬

科研費の分科・細目：内科系臨床・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：ベーチェット病 ヘムオキシゲナーゼ-1 IL-10 自己免疫 自己炎症 HLA-クラスI ERAP-1 TLR4

## 1. 研究開始当初の背景

ベーチェット病 (B病) は眼皮膚粘膜病変を主体とした原因不明の炎症性疾患である。従来、その病態は遺伝因子、環境因子の相互作用による自己免疫異常とする考えが有力であったが、自己抗体の欠如、症状出現パターン、コルヒチンの有効性などから自己炎症の要素もあると考えられてきた。2010年、GWASで *IL-10*、*IL-23R-IL-12RB2* が B病の感受性遺伝子として同定され、自己免疫、自己炎症の双方の関与が遺伝素因の観点から明らかにされた。

本研究のkey wordである heme oxygenase (HO)-1 は *IL-10* の産生を増強する一方で、*IL-10* により強く発現が誘導され、*IL-10/HO-1* 炎症制御系を構築している。研究代表者らは研究開始時までに TNF が HO-1 発現を抑制し、その発現低下が TNF 産生を増強する炎症増悪の悪循環を形成していること、BD では TLR4 へのリガンドが作用し、HO-1 発現が低下することを見出してきた。さらに、HO-1 は IRF-3 依存性に IFN 産生を誘導し、Th17 型自己免疫反応を制御することは報告された。以上の背景から、HO-1 の発現是正が自己炎症、自己免疫双方の新規治療法の開発につながる可能性があり、本研究テーマの着想につながった。

## 2. 研究の目的

本研究では「*IL-10/HO-1* 炎症制御系の破綻による自然免疫系の活性化に基づく過剰な炎症性サイトカインの産生と、HO-1 発現低下に伴う I 型 IFN の産生不全および *IL-23R* の遺伝素因に基づく Th17 の分化促成が BD の病態を形成する。」の仮説の妥当性を検証することで、将来的に HO-1 発現是正が BD 治療戦略となる可能性を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 疾患感受性遺伝子の解析

2000 例以上のトルコ人および日本人お BD 患者と対応する健常者サンプルを用い、全ゲノムで 814,474 SNP のゲノタイプを解析し、imputation 法を用いて、新規感受性遺伝子を同定した。また、既知の感受性遺伝子に加え、

自己炎症、自然免疫に関与する分子をコードする遺伝子について、BD 患者群、健常者群で DNA プールを作成し、エクソンシーケンズを行い、低頻度の疾患感受性アレルを含めて解析した。

### (2) HO-1 発現と M1/M2 マクロファージ

BD 患者および健常者の血清 HO-1、CD163 を ELISA で測定した。

### (3) BD 患者の臨床的知見

遺伝子解析、病態解析の基礎資料として BD の病型、疾患活動性、薬剤治療反応性などの臨床的解析を行った。

### (4) 破骨細胞分化における HO-1 の解析

HO-1 レプレッサー Bach1 欠損マウス (東北大 五十嵐教授より譲受) を用いて、RANKL、M-CSF 刺激による骨髄単核細胞 (bone marrow derived mononuclear cells: BMM) からの破骨細胞分化誘導系における HO-1 の役割を解析した。

## 4. 研究成果

米国 NIH との共同研究による遺伝子解析の成果を中心に本研究の目的からは副産物ともいえる BD の臨床的知見、骨破壊の制御に関する知見に関する成果を述べる。

### (1) 遺伝子解析

(主な発表論文等〔雑誌論文〕、参照)

*CCR1*、*STAT4*、*KLRC4*、*ERAP1*、*TLR4*、*NOD2*、*MEFV* など獲得免疫、自然免疫に関わる疾患感受性遺伝子を同定した。

興味深いことに *HLA-B\*5101* と *ERAP1* の疾患感受性アレルは遺伝子相互作用 (エピスタシス) を示した。*ERAP1* (endoreticulum aminopeptidase 1) は MHC 上に提示される抗原ペプチドをトリミングする酵素であることから、疾患感受性アレルが *HLA-B51* 上への疾患特異的な (自己) 抗原提示のプロセスに関与している可能性がある。現在、第三世代 *HLA-B\*5101* トランスジェニックマウス、*ERAP1* ノックインマ

ウスなどを樹立し、モデルを作成することで、その解析を進めている。

また、微生物の認識に関わる *TLR4*, *NOD2* やNK細胞受容体である *KLRC4* が疾患感受性遺伝子として同定されたことも、疾患への微生物の関与を宿主側の素因から強く支持している。*TLR4* については本研究の発想の起点となった「BD患者単核細胞はTLR4を過剰に発現し、そのリガンドの作用を受けることで活性化するとともにHO-1発現は低下し、さらなる炎症の増強を引き起こす」という知見とも矛盾しないものであった。

(2) HO-1発現とM1/M2マクロファージ  
(主な発表論文等〔雑誌論文〕参照)

BD患者および健常者の血清HO-1、CD163のELISAによる測定を開始したが、まだ、病状、病態との関連は整理できていない。今後、サイトカインや表面抗原解析と合わせ、継続検討(課題番号26461469)予定である。

(3) BDの臨床的知見

(主な発表論文等〔雑誌論文〕、  
、参照)

遺伝子解析の前提は正確な表現型の把握である。横浜市大2附属病院の412例を含めた全国規模の臨床的解析により、経年的な病像の変遷、腸管型、血管型BD患者の特徴、神経型、腸管型、血管型の診療ガイドラインなどを報告した。これらの知見は臨床的に重要なだけでなく、今後の遺伝子、病態解析でも重要な情報となるものと期待される。

(4) Bach1欠損における破骨細胞分化不全  
(主な発表論文等〔雑誌論文〕参照)

正常マウスでは破骨細胞分化過程の早期よりHO-1発現は低下するが、HO-1発現制御が不十分なBach1欠損マウスでは破骨細胞分化が阻害され、RANK, TRAF6, c-Fos, NFATc1の発現も低下した。これらのマーカーの発現不全はHO-1 shRNA導入により回復したが、RANKL刺激によるBlimp-1発現低下は不変だった。破骨細胞分化にはRANK

発現調節などHO-1依存性の部分とBlimp-1のように非依存性の経路も存在する。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計17件)

Hirohata S, Takeo M (7人中6番目), et al. Analysis of various factors on the relapse of acute neurological attacks in Behçet's disease. Mod Rheumatol. 査読有、2014 (in press)

<http://informahealthcare.com/mor>  
Lennikov A, Takeo M (12人中7番目), et al. Single center study on ethnic and clinical features of Behçet's disease in Moscow, Russia. Clin Rheumatol. 査読有 2014 (in press)

<http://link.springer.com/journal/10067>  
岳野光洋. ベーチェット病と妊娠. リウマチ科 査読無 2014 (印刷中)

<http://www.kahyo.com/category/A1-R>  
岳野光洋. ベーチェット病. 膠原病ハイグレード. 査読無 2014 (印刷中)  
(電子ジャーナルなし)

Ideguchi H, Takeo M (7人中6番目), et al. Gastrointestinal manifestations of Behçet's disease in Japan: a study of 43 patients. Rheumatol Int. 査読有 34: 2014, 851-6.

doi: 10.1007/s00296-013-2838-5.

Hisamatsu T, Takeo M (15人中12番目), et al. The 2nd edition of consensus statements for the diagnosis and management of intestinal Behçet's disease: indication of anti-TNF $\alpha$  monoclonal antibodies. J Gastroenterol. 査読有 49:2014, 156-62.

doi: 10.1007/s00535-013-0872-4.

Kirino Y, Takeo M (26人中14番目), et al. Targeted resequencing implicates

the familial Mediterranean fever gene MEFV and the toll-like receptor 4 gene TLR4 in Behçet disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 査読有 110:2013, 8134-9. doi:10.1073/pnas.1306352110.

Kirino Y, Takeo M (24人中17番目), et al. Genome-wide association analysis identifies new susceptibility loci for Behçet's disease and epistasis between HLA-B\*51 and ERAP1. Nat Genet. 査読有 45:2013, 202-7. doi:10.1038/ng.2520.

Hama M, Takeo M (11人中3番目), et al. Bach1 regulates osteoclastogenesis in a mouse model via both heme oxygenase 1-dependent and heme oxygenase 1-independent pathways. Arthritis Rheum. 査読有 64:2012, 1518-28. doi:10.1002/art.33497.

岳野光洋, 水木信久, 石ヶ坪良明. ベーチェット病の免疫異常と治療の進歩(総説). 日本脊椎関節炎学会誌 査読無 4: 2012, 13-8. (電子ジャーナルなし)

岳野光洋, 石ヶ坪良明. 【RA診療におけるエビデンス-ガイドライン、推奨、提言など】EULAR ベーチェット病診療 recommendation(解説/特集). リウマチ科 査読無 48: 2012, 75-9  
<http://www.kahyo.com/item/R201207-481>

Hirohata S, Takeo M (7人中6番目), et al. Clinical characteristics of neuro-Behçet's disease in Japan: a multicenter retrospective analysis. Mod Rheumatol. 査読有 22:2012, 405-13. doi:10.1007/s10165-011-0533-5.

Ideguchi H, Takeo M (6人中3番目), et al. Characteristics of vascular involvement in Behçet's disease in Japan: a retrospective cohort study.

Clin Exp Rheumatol. 査読有 29: 2011, S47-53.

<http://www.clinexprheumatol.org/pubmed/find-pii.asp?pii=21968236>

Nishida T, Takeo M (7人中6番目), et al. Clinical Course before and after Cataract and Glaucoma Surgery under Systemic Infliximab Therapy in Patients with Behçet's Disease. Case Rep Ophthalmol. 査読有 2:2011, 189-92. doi: 10.1159/000329190.

Inamori M, Takeo M. Behçet's disease and colon cancer. Intern Med. 査読無 50:2011, 537-8. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/internalmedicine/50/6/50\\_6\\_537/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/internalmedicine/50/6/50_6_537/_pdf)

岳野光洋他: Behcet 病の病態と単球・好中球. 炎症と免疫 査読無 19:2011, 487-90

[http://www.sentan.com/cgi-bin/db\\_n.cgi?mode=view\\_backno&no=809](http://www.sentan.com/cgi-bin/db_n.cgi?mode=view_backno&no=809)

岳野光洋石ヶ坪良明. 【膠原病の实地診療 プライマリケアと難治性病態の克服】 治療/实地医家のための最新の治療 新しいベーチェット病の治療のガイドラインとその使い方. Medical Practice 査読無 28: 2011, 1281-5 <http://www.fujisan.co.jp/product/1281681118/>

[学会発表](計14件)

Takeo M, et al Immunogenicity of infliximab modulates efficacy and safety in Behçet's disease patients with uveitis. American College of Rheumatology, 78<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting, San Diego (USA), 2013/10/29

Takeo M, et al. Clinical features of Japanese patients with vasculo-Behçet's disease: A multicentric study by Behçet's Disease Research Committee, MHLW. 14<sup>th</sup> Annual

European Congress of Rheumatology, 2013 A scientific meeting, Madrid (Spain), 2013/6/15.

岳野光洋,他. 血管型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, 国立国際会館(京都), 2013/4/19

岳野光洋, 吉見竜介, 他: ベーチェット病ぶどう膜炎に対するインフリキシマブ治療効果減弱時の薬理動態とその対策. 第 57 回日本リウマチ学会総会, 国立国際会館(京都), 2013/4/19

岳野光洋, 吉見竜介, 他: ベーチェット病ぶどう膜炎に対する抗 TNF 抗体の効果減弱とその対策. 第 27 回日本臨床リウマチ学会, 神戸ポートピア(兵庫), 2012/11/23

Takeo M.: Assessment of the disease (Epidemiology). Overview. 15th International Conference on Behçet's Disease, 横浜パシフィコ(神奈川), 2012/7/14

岳野光洋. 治療からみたベーチェット病の免疫異常, 第 5 回自己炎症研究会, 福岡朝日ビル(福岡), 2012/ 7/6

岳野光洋, 吉見竜介, 他: ベーチェット病に対する抗 TNF 抗体治療の有効性と問題点. 第 33 回日本炎症・再生医学会, ホテル日航福岡(福岡), 2012/ 7/5

岳野光洋, 他. 腸管ベーチェット病ガイドラインの改定案, 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会, グランドプリンスホテル新高輪(東京), 2012/4/27

岳野光洋. ベーチェット病の臨床と治療の進歩. 平成 23 年度 石川地区リウマチ教育研修会. ホテル金沢(石川), 2011/11/13

Takeo M., et al :Behçet's Disease Reserch Commitee of Japan. Consensus Statements for Management for Intestinal Behçet's Disease in Japan.

American College of Rheumatology 76th Annual Scientific Meeting, Chicago (USA), 2011/11/8

岳野光洋,他. ベーチェット病の免疫異常と治療の進歩. 第 21 回日本脊椎関節炎学会. 岡山コンベンションセンター(岡山), 2011/9/17

岳野光洋,他. Bach1 による抗炎症蛋白ヘムオキシゲナーゼ-1 の発現制御・炎症性疾患への治療応用. 第 55 回日本リウマチ学会総会, 神戸ポートピア(兵庫), 2011/7/19

岳野光洋,他. ヒト単球における Bach1 による heme oxygenase-1 の発現調節. 第 32 回日本炎症・再生医学会・学術集会, 国立国際会館(京都), 2011/6/3

〔図書〕(計 1 件)

Takeo M., et al. Vascular involvement of Behçet's disease. Behçet's disease: from bench to bed. (Ishigatsubo Y ed.), Springer, Tokyo, 2014, in press

〔産業財産権〕  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岳野 光洋 (TAKENO MITSUHIRO)  
横浜市立大学・医学部・准教授  
研究者番号: 50236494

### (2) 研究分担者

吉見 竜介 (YOSHIMI RYUSUKE)  
横浜市立大学・医学部・助教  
研究者番号: 70585265