

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861620

研究課題名(和文) アクネ菌を用いたサルコイドーシスぶどう膜炎モデルの樹立と解析

研究課題名(英文) Establishment and analysis of experimental model of sarcoid uveitis using propionibacterium acnes.

研究代表者

宮永 将 (Miyanaga, Masaru)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・非常勤講師

研究者番号：30599600

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：サルコイドーシスは眼、肺、皮膚などに肉芽腫を形成する、原因不明の炎症性疾患である。近年、皮膚常在菌であるアクネ菌がサルコイドーシスの肉芽腫の内部に存在する事が分かり、アクネ菌に対する免疫反応がサルコイドーシスの原因と考えられている。本研究は、マウスの尾静脈からアクネ菌生菌を注射する事でアクネ菌感染マウスを作成し、続いてアクネ菌に対する細胞性免疫反応を誘導する事でアクネ菌を中心とした肉芽腫を形成する眼サルコイドーシス実験モデルの作成を試みた。その結果、多くの実験マウスの肺と肝臓に肉芽腫が形成され、その中にアクネ菌に対する抗体で染まる部位が確認されたが、眼内には肉芽腫性炎症は観察されなかった。

研究成果の概要(英文)：Sarcoidosis is an inflammatory disorder of unknown etiology, featured by granuloma formation in the eye, lung, and skin. Recent studies revealed that propionibacterium acnes, normal bacterial flora in the skin, is present in the granuloma, and it is implicated that immune reaction against P. acnes is the cause of sarcoidosis. In this study, we attempted to establish P. acnes infected mice by tail vein injection of viable P. acnes, and to establish animal model of granulomatous inflammation by inducing cellular immunity against P. acnes by active immunization. As a result, most of the experimental mice showed granuloma formation and positive signal against P. acnes in the granuloma by immunohistochemical analysis. However, there was no granuloma or inflammation in the eye.

研究分野：眼科学

キーワード：サルコイドーシス ぶどう膜炎 アクネ菌

## 1. 研究開始当初の背景

サルコイドーシスは全身諸臓器、特に眼、肺、皮膚などに非乾酪壊死性類上皮細胞肉芽腫を形成する、原因不明の炎症性疾患である。サルコイドーシスに罹患する頻度が最も高い臓器は肺であり、次いで眼である事が知られている。<sup>1</sup>

眼症状としては、眼内炎症性疾患であるぶどう膜炎を呈し、我が国のぶどう膜炎の原因疾患としても、最も頻度が高い事が報告されている。<sup>2,3</sup> 一般的にステロイド治療に良好に反応する疾患ではあるが、多くの症例で慢性化し、それによる続発緑内障や視神経障害などの不可逆的な視覚障害に陥る事も少なくない。そのため、サルコイドーシスを適切に治療する事は、患者の視機能、時には生命を守るために重要である。しかし、長期のステロイド治療は多くの副作用を伴い、全身投与では耐糖能異常や骨粗鬆症、中心性肥満、局所投与ではステロイド緑内障や白内障などが問題となる。そのため、サルコイドーシスの根本的な原因の解明と治療法の開発が切望されている。

サルコイドーシスを特徴付ける最も基本的な病態は、乾酪壊死を伴わない類上皮細胞肉芽腫の存在であるが、これは炎症反応により排除出来ない起炎物質を局所に封じ込める生体防御機構の一つである。そのため、サルコイドーシスの肉芽腫内に何らかの病原微生物が存在している事が想定され、それに対して我が国では 1970 年代に厚生省難病研究班により、サルコイドーシス患者病変部組織に対する徹底的な微生物学的検索が行われた。その結果、唯一分離された微生物がアクネ菌であった。<sup>4</sup> その後の研究で日本人のサルコイドーシス患者のリンパ節生検体のパラフィン切片の解析において、アクネ菌あるいはアクネ菌と同じ皮膚常在菌である *Propionibacterium granulorum* の DNA が定量的 PCR 法により多量に検出された。<sup>5</sup> また *in situ hybridization* 法によりサルコイドーシスの病変部局所の肉芽腫内部にアクネ菌の DNA が集積して存在する事も明らかとなり<sup>6</sup>、アクネ菌がサルコイドーシスの肉芽腫形成に積極的に関与している事が改めて強く示唆された。一方、サルコイドーシス患者の病変部リンパ節の組織懸濁液をマウスに免疫する事で、肉芽腫の内部に存在する未知の起炎物質に対する単クローン抗体を作成したところ、この抗体はアクネ菌のみに対して特異的に反応し、結核菌などの他の菌類には全く反応しなかったため、これもサルコイドーシス病変部肉芽腫にアクネ菌が関与する事を強く示唆するものとなった。<sup>7</sup> このようにして作製された単クローン抗体の一つで、アクネ菌の菌体細胞膜から細胞壁を貫いて分布する糖脂質抗原(リポタイコ酸)を認識する PAB 抗体を用いてサルコイドーシス患者の各種臓器の生検組織切片に対する免疫染色を行った結果、罹患臓器に拘らず高

い陽性率を示した。これらの結果より、サルコイドーシスの罹患臓器におけるアクネ菌の関与が強く示された。

これらの研究経緯から、アクネ菌はヒトの末梢肺組織や肺門部リンパ節からも約半数の症例で培養可能である事が明らかとなった。<sup>8</sup> これはアクネ菌が外部環境から経気道的に生体内に侵入した結果、不顕性感染を生じたものであり、その後何らかの環境要因(ストレス、生活習慣など)を契機に内因性に活性化し細胞内増殖するものと考えられる。

細胞内増殖の際に肉芽腫による封じ込めを逃れたいわゆる感染型アクネ菌は、病変部局所に新たな潜伏感染を引き起こすのみならず、リンパ向性あるいは血行性に全身諸臓器に新たな潜伏感染と、それに続く再度の内因性活性化と肉芽腫形成を生じると考えられ、サルコイドーシスにおけるぶどう膜炎はこの段階で生じるものと推察される。

我々は、アクネ菌が感染している生体にアクネ菌特異的な細胞性免疫反応が惹起される事で、サルコイドーシスに類似した炎症性肉芽腫の形成が誘導されると仮説を立てた。これを証明するためには、動物モデルによる病態の再現と解析が必須であるが、これまでにアクネ菌感染による肺病変のマウスモデルは存在するものの<sup>9</sup>、眼病変の動物モデルは報告されていない。

## 2. 研究の目的

1) アクネ菌をマウス尾静脈に注射し、アクネ菌感染マウスを作成し、全身諸臓器におけるアクネ菌感染部位の分布を調べる。

2) アクネ菌感染マウスに対してアクネ菌の強化免疫を行う事でアクネ菌特異的な細胞性免疫を誘導し、アクネ菌感染臓器を標的とした肉芽腫性炎症を惹起した眼サルコイドーシスの実験モデルを作成し、その病態を解析する。

## 3. 研究の方法

### 1) アクネ菌感染マウスの作成

アクネ菌感染マウスの作成には、6 から 8 週齢の C57Bl6 マウス、Balb/c マウスを用いた。アクネ菌には 2 種類の serotype が存在する事が知られるが、本研究ではサルコイドーシス患者組織から分離されるアクネ菌の 7 割を占め、細胞内に侵入できるアクネ菌 serotype 1 を用いた。このアクネ菌の生菌、細胞壁欠失型アクネ菌を、マウス生体内への感染成立を目的として、それぞれマウスの尾静脈から静脈注射して用いた。注射後さまざまな時期に屠殺した後に眼球、肺、肝臓、脾臓などを摘出し、アクネ菌特異的抗体(PAB 抗体)を用いた免疫組織化学染色を行い、その分布を調べた。

### 2) 眼サルコイドーシス実験モデルの作成

アクネ菌感染マウスに、アクネ菌特異的な細胞性免疫応答を惹起するために、アクネ菌と結核死菌を含む完全フロイントアジュバントと1:1に混合し、超音波破碎装置を用いてエマルジョンを作成した。アクネ菌感染マウスの背部への皮下注射を2週間間隔で計3回施行した。最終免疫から1週間後にマウスを屠殺し、眼球、肺、肝臓などを摘出した。これらを10%ホルマリン緩衝液による固定後にヘマトキシリン-エオジン染色を行い、炎症性細胞浸潤および肉芽腫形成の有無を検索した。

#### 4. 研究成果

##### 1) アクネ菌感染マウスの作成

アクネ菌 serotype I を尾静脈から1~3回注射したマウスの肺、肝臓、脾臓を様々な時期に摘出し、PAB抗体による免疫組織化学染色を施行した結果、全てのマウスの肝臓において(図1) また約7割のマウスの肺において(図2) PAB抗体陽性像が認められた。PAB抗体陽性像が最も多く見られたのは、アクネ菌の尾静脈注射を3回施行し、最終注射から3日後に屠殺したマウスにおいてだった。これにより、多くのマウスでアクネ菌の感染が全身諸臓器に成立している可能性が示唆された。

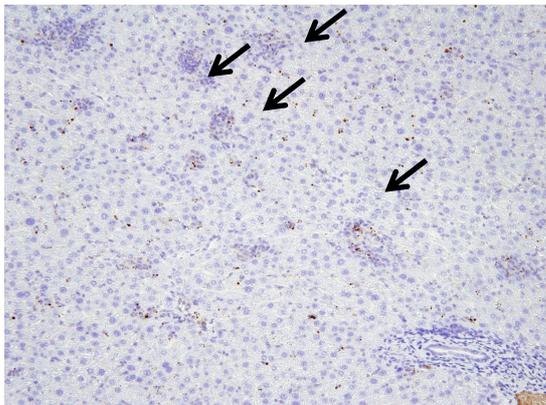


図1 . アクネ菌注射マウス肝臓における PAB抗体陽性像(矢印)

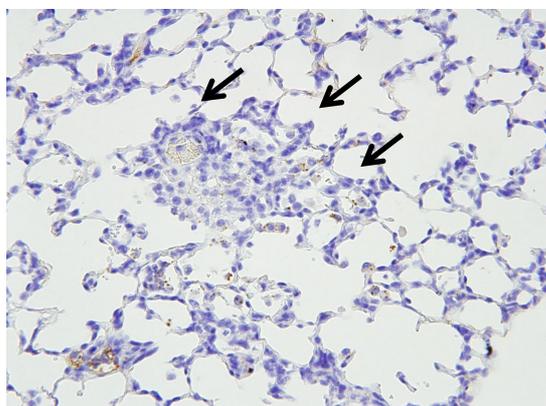


図2 . アクネ菌注射マウス肺における PAB抗体陽性像(矢印)

一方、眼内においてはPAB抗体陽性像が見られた例はあったものの、これはごく少数例に留まり、またその陽性像も組織切片一つあたりに数個程度であった。この結果は、眼内、特に脈絡膜は血流が豊富な組織であるにも関わらず、他の全身諸臓器と比較してアクネ菌の感染効率が低い事を示すものと考えられた。そのため、アクネ菌生菌と同様に細胞壁欠失型アクネ菌をマウス尾静脈から注射し、眼組織におけるPAB抗体染色像を確認したが、結果は同様であった。

##### 2) 眼サルコイドーシス実験モデルの作成

アクネ菌感染マウスに対してアクネ菌死菌を強化免疫した後に屠殺し、諸臓器の肉芽腫形成を調べた。その結果、肺(図3)と肝臓において肉芽腫の形成が確認された。

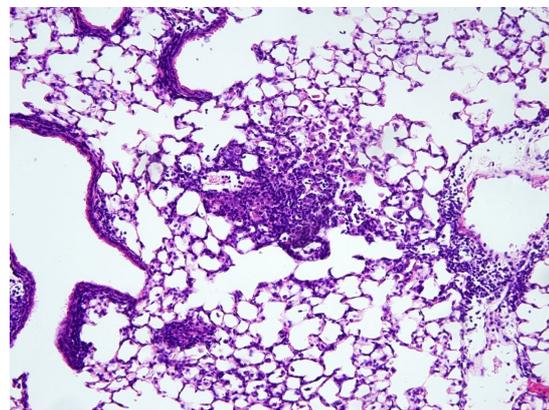


図3 . アクネ菌生菌を静脈注射し、アクネ菌死菌を3回強化免疫後に屠殺した C57b16 マウス肺の HE 染色像。中央部に肉芽腫形成がみられる。

次に、肉芽腫がみられた組織切片をPAB抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、肉芽腫内におけるアクネ菌の局在を調べた。その結果、肺(図4) 肝臓(図5)それぞれにおいて、肉芽腫内にPAB抗体陽性像が観察された。

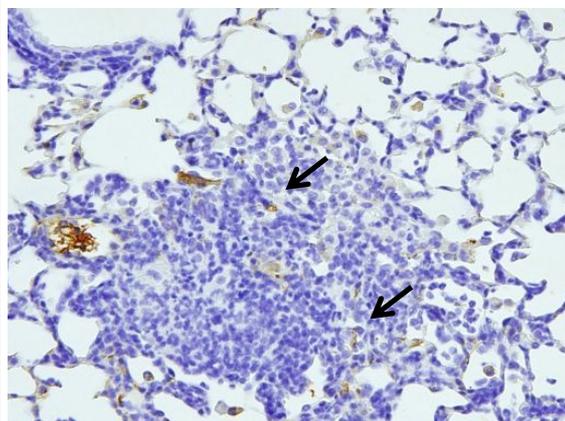


図4 図3と同部位の PAB抗体陽性像(矢印)。

一方、Balb/c マウス眼内には明らかな網脈絡膜炎症、あるいはその他の眼内組織炎症は眼底検査、組織学的検査によって検出されな

った。(図6)

眼内にアクネ菌を中心とする肉芽腫病変が形成されない原因としては眼内に侵入、感染したアクネ菌の菌量の少なさが考えられた。この理由として我々は、アクネ菌が免疫応答によって拒絶、排除されている可能性を考え、現在アクネ菌に対する経口免疫寛容の誘導を試み、それを用いたアクネ菌感染実験を行っている。

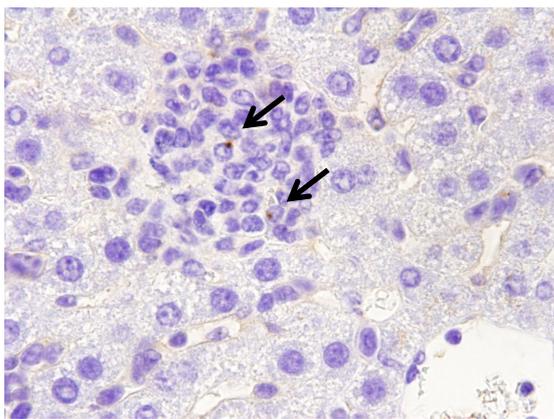


図5 . アクネ菌生菌を静脈注射後に死菌を3回強化免疫し、肉芽腫が形成された C57b16 マウス肝臓。肉芽腫内に PAB 抗体陽性像(矢印)が見られる。

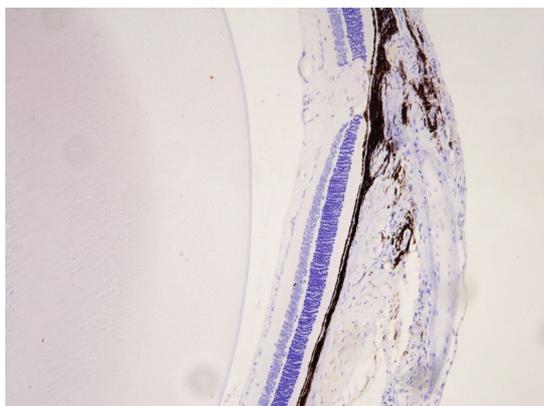


図6 . アクネ菌生菌を静脈注射後に死菌を3回強化免疫した C57b16 マウス眼球。視神経乳頭、網膜、脈絡膜に肉芽腫形成および炎症細胞浸潤は観察されなかった。

#### <引用文献>

1. 高瀬博, 江石義信: 【ぶどう膜炎の研究最前線 2013】サルコイドーシス. あたらしい眼科 30: 313-319, 2013
2. Goto H, Mochizuki M, Yamaki K, et al.: Epidemiological survey of intraocular inflammation in Japan. Jpn J Ophthalmol 51: 41-44, 2007
3. Ohguro N, Sonoda KH, Takeuchi M, et al.: The 2009 prospective multi-center epidemiologic survey of uveitis in Japan. Jpn J Ophthalmol 56: 432-435, 2012
4. Abe C, Iwai K, Mikami R, et al.: Frequent isolation of Propionibacterium

acnes from sarcoidosis lymph nodes. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A 256: 541-547, 1984

5. Ishige I, Usui Y, Takemura T, et al.: Quantitative PCR of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes of Japanese patients with sarcoidosis. Lancet 354: 120-123, 1999

6. Yamada T, Eishi Y, Ikeda S, et al.: In situ localization of Propionibacterium acnes DNA in lymph nodes from sarcoidosis patients by signal amplification with catalysed reporter deposition. J Pathol 198: 541-547, 2002

7. Negi M, Takemura T, Guzman J, et al.: Localization of propionibacterium acnes in granulomas supports a possible etiologic link between sarcoidosis and the bacterium. Mod Pathol 25: 1284-1297, 2012

8. Ishige I, Eishi Y, Takemura T, et al.: Propionibacterium acnes is the most common bacterium commensal in peripheral lung tissue and mediastinal lymph nodes from subjects without sarcoidosis. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis 22: 33-42, 2005

9. Nishiwaki T, Yoneyama H, Eishi Y, et al.: Indigenous pulmonary Propionibacterium acnes primes the host in the development of sarcoid-like pulmonary granulomatosis in mice. Am J Pathol 165: 631-639, 2004

#### 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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:

番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

宮永 将 (MIYANAGA, Masaru)  
東京医科歯科大学・医学部附属病院・非常  
勤講師  
研究者番号：30599600

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

高瀬 博 (TAKASE, Hiroshi)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究  
科・講師  
研究者番号：20451940