

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 22 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461469

研究課題名(和文) ベーチェット病におけるM2マクロファージ機能不全とその修復による治療戦略

研究課題名(英文) Impaired M2 macrophage function in Behcet's disease as a therapeutic target

研究代表者

岳野 光洋 (Takeno, Mitsuhiro)

日本医科大学・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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではベーチェット病(B病)のHO-1発現低下、遺伝的なIL-10産生低下より、抗炎症性M2マクロファージの機能不全がB病炎症病態の本質であるとの仮説を立てた。末梢血単球からGM-CSFおよびM-CSFにより分化誘導したM1、M2細胞において、M2細胞はHO-1、IL-10に加え、B病疾患感受性遺伝子であるCCR1を発現し、MIP-1aに対して高い遊走能を示した。このことはB病のマクロファージ機能異常がM2細胞機能不全に集約されることを示している。また、M1細胞はM-CSF添加によりIL-10産生などのM2形質を獲得することから、その形質転換がB病治療戦略となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to show a critical role of defective anti-inflammatory M2 macrophage function in Behcet's disease (BD), because previous studies have shown that defective heme oxygenase-1 (HO-1) expression and IL-10 production are involved in BD. We established in vitro M1 and M2 differentiation systems using GM-CSF and M-CSF, respectively. M2 cells preferentially expressed CCR1, which is also functionally impaired in BD, in addition to HO-1 and IL-10, and migrated more sensitively to MIP-1a than M1 cells. These data suggest that M2 macrophage dysfunction is implicated in development of BD inflammation. Furthermore, in vitro induced M1 cells acquired capacity of IL-10 production in presence of M-CSF, indicating the functional plasticity of macrophages. This findings suggested that phenotypic conversion of macrophages is a promising therapeutic strategy for BD.

研究分野：臨床リウマチ学

キーワード：ベーチェット病 M1マクロファージ M2マクロファージ IL-10 CCR2

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炎症性疾患で、遺伝素因に病原微生物など環境因子が加わり免疫異常をきたし、発症に至ると考えられる。その機序には自己免疫、自己炎症の双方が関与すると想定される。研究代表者自身らはB病患者において熱ショック蛋白 (HSP65) 特異的Th1型細胞による自己免疫機序の関与を報告した一方、HLA-B51の好中球機能過剰への関与、TLR4の過剰発現とヘムオキシゲナーゼ (HO) -1産生不全、TNF- α の過剰産生と抗TNF- α 抗体による治療効果との関連、 $\gamma\delta$ 型T細胞の異常、NK細胞のKIR発現異常など様々な自然免疫系の異常も指摘してきた。

さらに、2010年、日本およびトルコ・米国のグループで独立して行われた二つのGWASによりHLA-B51以外に *IL10*、*IL23R-IL12RB2*疾患感受性遺伝子として同定されたのを皮切りに次々と免疫機能分子の遺伝子が疾患感受性に寄与することが明らかになった。T細胞内刺激伝達系の *STAT4* およびHLA-クラスI分子への提示ペプチドをトリミングする酵素である *ERAP-1* など自己免疫の関与が支持される一方、ケモカイン受容体 *CCR1*、*KLRC4*、*IL1A-IL1B* などに加え、*TLR4*、*NOD2*、*MEFV(M694V)* などPAMPs 認識分子を含めた自然免疫系の寄与も明確にされた。この成績は宿主の遺伝素因の成績でありながら、環境因子としての病原微生物の関与を決定的にした。

一方、近年、腫瘍免疫の分野などでマクロファージの機能の多様性が解析され、従来の炎症惹起に働く古典的マクロファージ、M1型に加え、炎症制御に働くM2型に分類することが提唱され、それぞれに機能と腫瘍進展、予後との関連が注目されてきた。しかし、リウマチ性炎症疾患におけるM1/M2の異常についてはほとんど報告がない。

そこで、本研究ではB病におけるM1/M2

マクロファージの分化と機能に着目した。これまでの成績ではGWASにより同定された疾患感受性遺伝子 *IL10* アレルはその産生低下を規定すること、M2マクロファージの機能的マーカーとされるHO-1の発現がB病患者活動期に低下することなどM2マクロファージの機能不全を示唆する成績が示されている。HO-1は *IL-10* 産生を誘導し、*IL-10* 産生はさらにHO-1発現を増強し、炎症制御過程に重要な役割を担っている。したがって、これまでの知見はB病におけるM2マクロファージの量的あるいは質的異常に集約される可能性が高い。さらに、その是正ができれば、新規治療につながるものと期待される。

2. 研究の目的

B病患者において末梢血単球からのM1/M2分化に健常者と質的あるいは量的差異があるか検討する。また、その是正手段を追求することで、マクロファージを標的とした新規治療開発の可能性について検討する。

3. 研究の方法

1) 細胞単離と培養

既報に基づき、ヒト末梢血単核細胞よりMACSを用いたnegative selectionにより単球を純化し、*in vitro* でGM-CSFおよびM-CSF存在下で9日間培養するとことで、M1およびM2マクロファージへの分化を誘導した。

2) 細胞形質の可塑性の検討

末梢血単球を以下の4条件で培養後の形質、機能を比較検討した。

	前半9日間	後半9日間
M1g	GM-CSF	GM-CSF
M1m	GM-CSF	M-CSF
M2g	M-CSF	GM-CSF
M2m	M-CSF	M-CSF

3) 細胞表面抗原

CD63、CD163、CCR1 の細胞表面上での発現はフローサイトメトリー、免疫化学法により解析した。

4) サイトカイン産生

細胞をLPSで刺激後、上清中のIL-6、IL-10、TNF- α をELISA法で測定した。

5) real time PCR 法

細胞よりRNAを抽出し、real time PCR法により、HO-1、CD163、IL-6、IL-10、TNF- α 、CCR1などのmRNA発現を半定量的に解析した。

6) 遊走能の解析

Transwell chamberを用いて、下層に種々の濃度のMIP-1 α を添加し、上層の細胞の遊走を算定した。

4 . 研究成果

1) *in vitro*におけるM1/M2マクロファージ分化誘導系の確立

ヒト末梢血単球をGM-CSF (M1培養) およびM-CSF (M2培養) 存在下で9日間培養後、M2分化マーカーであるCD163、HO-1のmRNAおよび蛋白発現はM2条件で有意に高かった。こうして樹立した健常者由来M1/M2マクロファージはLPS刺激に反応し、ほぼ同等のTNF- α 、IL-6を産生するが、IL-10を産生するのはM2のみであった。

2)M1/M2マクロファージのCCR1発現と遊走能

B病の疾患感受性遺伝子の一つであるCCR1は健常者由来M2マクロファージに選択的に発現し、そのリガンドであるMIP-1 α に反応し、M1より高い遊走能を示した。

一方、B病患者の末梢血からもほぼ同様にM1/M2マクロファージが分化誘導されたが、M1におけるCCR1発現は健常者由来M1より亢進していた。したがって、炎症局所からのMIP-1 α などのケモカインに対して、健常者では主にM2マクロファージが集積し、炎

症制御機転が働くのに対し、B病患者では、その機能が低下している。さらに、M1マクロファージのCCR1発現が増加していることから、炎症局所では量的にも質的にもM1優位となるため、炎症制御が不十分となり、むしろ増幅すると考えられる。

3) 成熟M1/M2マクロファージの可塑性

末梢血単球から分化誘導した最終的な形質、機能は後半の培養条件により強く依存し、CD163およびIL-10のmRNA発現はどれもM1m>M1g、M2m>M2gの関係にあった。IL-6mRNA発現はM1g>M1mで、M2gとM2mはほぼ同等であり、CCR1はM1gとM1mがほぼ同等で、M2g<M2mであった。以上の結果より、マクロファージの形質および機能には可塑性があることが明らかになった。同様の成績はB病由来単球でも再現され、マクロファージの形質転換がB病治療戦略の一つとなる可能性が示唆された。

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16件)

岳野光洋. ベーチェット病の神経病変. リウマチ科 57(5):473-480, 2017 <http://www.kahyo.com/item/R201705-575>

Arimoto J, Takeno M (14人中10番目),

et al. Clinical value of capsule endoscopy for detecting small bowel lesions in patients with intestinal

Behçet's disease. Dig Endosc. 査読有 28:179-85, 2016 doi: 10.1111/den.12552

Kirino Y, Takeno M (21人中3番目), et al. Continuous evolution of clinical phenotype in 578 Japanese patients with Behçet's disease: a retrospective observational study. Arthritis Res Ther. 査読有 18:217, 2016

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5048408/>
岳野光洋. ベーチェット病の免疫病態. 日本医科大学医学会雑誌. 査読有 12:15-25, 2016
https://www.jstage.jst.go.jp/article/manms/12/1/12_15/_pdf
Lennikov A, Takeno M (12人中7番目), et al Single center study on ethnic and clinical features of Behcet's disease in Moscow, Russia. Clin Rheumatol. 査読有 34:321-7, 2015 doi: 10.1007/s10067-013-2442-9
Hirohata S, Takeno M (7人中6番目), et al. Retrospective analysis of long-term outcome of chronic progressive neurological manifestations in Behcet's disease. J Neurol Sci. 査読有 349:143-8., 2015 doi: 10.1016/j.jns.2015.01.005
Ueda A, Takeno M, Ishigatsubo Y. Adalimumab in the management of Behcet's disease. Ther Clin Risk Manag. 査読有 11:611-9 2015 doi: 10.1016/j.jns.2015.01.005
岳野光洋. ベーチェット病. 免疫症候群 (第2版)日本臨床 査読無 別冊 625-630, 2015, http://www.nippon-rinsho.co.jp/backnum/s_mokuji/7311meneki1.html
岳野光洋. ベーチェット病の血管病変. 呼吸と循環 査読無 63:1081-1086, 2015 <http://doi.org/10.11477/mf.1404205843>
岳野光洋. 自己炎症疾患としてのベーチェット病. リウマチ科 査読無 54:191-197, 2015 <http://www.kahyo.com/item/R201508-542>
岳野光洋. ベーチェット病の血管病変 リウマチ科 査読無 53:578-584, 2015, <http://www.kahyo.com/brand/b-R201506-536>
Hisamatsu T, Takeno M, (15人中12番目

), et al. The 2nd edition of consensus statements for the diagnosis and management of intestinal Behcet's disease: indication of anti-TNF α monoclonal antibodies. J Gastroenterol. 査読有 49:156-62, 2014 doi: 10.1007/s00535-013-0872-4
Ideguchi H, Suda A, Takeno M, et al. Gastrointestinal manifestations of Behcet's disease in Japan: a study of 43 patients. Rheumatol Int. 査読有 2013 34:851-6. doi: 10.1007/s00296-013-2838-5.
Hirohata S, Takeno M (7人中6番目), et al. Analysis of various factors on the relapse of acute neurological attacks in Behcet's disease. Mod Rheumatol. 査読有 24:961-5, 2014 doi: 10.3109/14397595.2014.891496
岳野光洋. 血管型 Behcet 病の診療ガイドライン. 炎症と免疫 査読無 22:58-63, 2014 <http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=ae6esmeb/2014/002205/012&name=0370-0375j&UserID=202.209.187.131>
岳野光洋. ベーチェット病と妊娠. リウマチ科. 査読無 52 69-75, 2014 <http://www.kahyo.com/item/R201407-521>
〔学会発表〕(計23件)
副島裕太郎、桐野洋平、岳野光洋、他: ベーチェット病患者のサブグループ化と個別改良に向けての展望. 第61回日本リウマチ学会総会・学術集会 2017年4月21~23日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)
菊池弘敏、岳野光洋(7人中4番目)、他: 神経ベーチェット病の診療のガイドライン改訂に向けて. 第61回日本リウマチ学会総会・学術集会 2017年4月21~23日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)

岳野光洋、他: ベーチェット病深部静脈血栓症に対する抗凝固療法. 第 61 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2017 年 4 月 21~23 日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)

岳野光洋: ベーチェット病と toll 様受容体. 第 121 回 日本眼科学会総会、2017 年 4 月 6~9 日、東京国際フォーラム(東京都千代田区)

Takeo M: Vascular involvement of Behçet's disease. The 18th International Vasculitis & ANCA Workshop, 2017 年 3 月 25~28 日、東京(日本)

Nakano H, Kirino Y, Takeo M, (7 人中 5 番目) et al. Functional Analysis of Macrophages in Behçet's Disease: C-C Chemokine Receptor Type 1 (CCR1) and IL-10 Are Implicated in Pathogenesis of the Disease. 81st American College of Rheumatology, 2016 年 11 月 13~16 日ワシントン DC(アメリカ合衆国)

Hirohata S, Takeo M(7 人中 6 番目), et al. Effects of infliximab in chronic progressive Behçet's disease: influence the time of introduction on the outcome of the patients. 17th international congress on Behçet's disease. 2016 年 9 月 15~17 日、マテラ(イタリア)

Kirino Y, Takeo M (23 人中 17 番目), et al. Transition of clinical manifestation in Japanese Behçet's disease. Retrospective study of 579 patients. 17th international congress on Behçet's disease. 2016 年 9 月 15~17 日、マテラ(イタリア)

Nakano H, Kirino Y, Takeo M (6 人中 5 番目), et al. Functional analysis of M1 and M2 macrophage in Behçet's disease. 17th international congress on Behçet's

disease. 2016 年 9 月 15~17 日、マテラ(イタリア)

岳野光洋: 自己免疫と自己炎症の接点『ベーチェット病の病態』. 第 119 回日本小児科学会学術集会. 2016 年 5 月 13~15 日、ロイトン札幌(北海道札幌市).

東谷佳奈、桐野洋平、岳野光洋(23 人中 18 番目)、他. 日本人ベーチェット病の臨床像の変化: 584 例の解析. 2016 年 4 月 21~23 日、パシフィコ横浜、(神奈川県横浜市)

岳野光洋、他: 血管ベーチェット病診療ガイドライン案の外部評価. 第 60 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2016 年 4 月 21~23 日、パシフィコ横浜、(神奈川県横浜市)

桐野洋平、岳野光洋、他. ベーチェット病特殊病型の診断の問題点: 590 例の解析. 第 60 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2016 年 4 月 21~23 日、パシフィコ横浜、(神奈川県横浜市)

岳野光洋. ベーチェット病における自己免疫と自己炎症(特別講演モーニングセミナー). 第 39 回皮膚脈管・膠原病研究会 2016 年 1 月 22~23 日、高知市文化プラザかんぼーる(高知県高知市).

Takeo M. Current topics of Behçet's disease in Japan: anti-TNF therapy in management of Behçet's disease. (Invited lecture) The 16th Annual Meeting of the Korean Society for Behçet's Disease. 2015 年 10 月 29 日、ソウル(韓国)

岳野光洋、他: 厚労省基準特殊型ベーチェット病における国際基準との解離. 第 43 回日本臨床免疫学会総会. 2015 年 10 月 22~24 日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

Takeo M, et al: Immunogenicity of infliximab is responsible for reduced efficacy and infusion reaction in Behçet's disease with uveitis. Annual European Congress of Rheumatology EULAR 2015, 2015年6月10~13日、ローマ(イタリア)

岳野光洋、他: ベーチェット病インフリキシマブ治療における血中濃度・抗薬物抗体と効果・安全性の関連. 第59回日本リウマチ学会総会 2015年4月23~25日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

Hirohata S, Takeo M (7人中6番目), et al. Behcet's syndrome, central nervous system involvement, infliximab, methotrexate (MTX) and prognostic factors. 79th American College of Rheumatology, 2014年11月8~11日、ボストン(アメリカ合衆国)

⑳ Takeo M, et al. Anti-infliximab antibody is associated with reduced efficacy and infusion reaction in Behçet's Disease. 16th International Conference on Behçet's Disease, 2014年9月18~20日、パリ(フランス)

㉑ Takeo M, et al. Draft of recommendations for the management of vasculo-Behçet's disease in Japan. 16th International Conference on Behçet's Disease, 2014年9月18~20日、パリ(フランス)

㉒ 岳野光洋、他. ベーチェット病における抗インフリキシマブ抗体の出現と安全性・有効性. 第58回日本リウマチ学会総会・学術集会、2014年4月24~26日、高輪プリンス(東京都品川区)

[図書](計6件)

岳野光洋. ベーチェット病. リウマチ病学テキスト. (山本一彦他編) 診断と治療社、東京、pp400-408、2016

岳野光洋. Behcet 病. 膠原病・リウマチ・アレルギー. 研修医ノート(上阪等編集) 診断と治療社、東京、p357-9、2016

Ishigatsubo Y, Takeo M: Overview. Behçet's disease. (Ed by Ishigatsubo Y), Springer, Tokyo, Japan, pp 1-20, 2015

Takeo M, et al: Vascular involvement of Behçet's disease. Behçet's disease. (Ed by Ishigatsubo Y), Springer, Tokyo, Japan, pp 79-100, 2015

Ishigatsubo Y, Takeo M: Perspective. Behçet's disease. (Ed by Ishigatsubo Y), Springer, Tokyo, Japan, pp 151-172, 2015

岳野光洋. ベーチェット病. リウマチ・膠原病診療ハイグレード. 分子標的/Bio時代のリウマチ・膠原病治療ストラテジー(松本功他編) 文光堂、東京、pp390-399、2015

[産業財産権]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岳野 光洋 (TAKENO MITSUHIRO)
日本医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 50236494

(2) 研究分担者

桐野 洋平 (KRINO YOHEI)
横浜市立大学・医学部・講師
研究者番号: 50468154