

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 4月29日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591107

研究課題名（和文） 自然免疫系の活性制御システムの構築：難治性肉芽腫疾患の新規治療法開発

研究課題名（英文） Construction of the control system of activity of innate immune system: New cure development of an intractable granulomatous disease.

研究代表者

田邊 剛 (TANABE TSUYOSHI)

島根大学・医学部・准教授

研究者番号：80260678

研究成果の概要（和文）：

クローン病やサルコイドーシスの治療へ応用するため、バックグラウンドの低い NOD family の変異体を作製した。またドミナントネガティブ体を作製し、Blau 症候群の治療への応用を目指した。NOD family 活性制御因子のアポトーシス誘導能を明らかにした。サルコイドーシスの病因として、アクネ菌に対する免疫応答不全による Th-1 と Th-17 のバランス異常を明らかにした。さらに血液幹細胞から骨髄系細胞への分化段階の NOD2 の異常が、白血病の発症に関連することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

In order to apply to the medical treatment of Crohn's disease or sarcoidosis, the mutant of low NOD family of a background was produced. Moreover, the dominant negative mutant was produced and the application to the medical treatment of Blau syndrome was aimed at. Apoptosis induction ability of the NOD family active control agent was clarified. As a cause of sarcoidosis, the abnormalities in balance of Th-1 and Th-17 by the immune response insufficiency to *P. acne* were clarified. The abnormalities of NOD2 of the differentiation stage from blood stem cell to myeloid cell showed clearly that it relates to development of symptoms of leukemia.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,900,000 | 570,000 | 2,470,000 |
| 2011年度 | 700,000   | 210,000 | 910,000   |
| 2012年度 | 700,000   | 210,000 | 910,000   |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：自然免疫、NOD family、サルコイドーシス、クローン病

## 1. 研究開始当初の背景

サルコイドーシスやクローン病などの肉芽腫形成疾患は難治性であり、近年罹患率が著明に増加し、臨床上問題となっている。増加の原因の一つとして食生活の欧米化が想定

されているが、詳細は不明である。治療に関しては、食事療法や免疫抑制剤が試みられているものの、十分な効果が得られているとは言えない。難治性肉芽腫形成疾患の発症機構を分子レベルで解析し、特異的治療法を開発

することが求められている現状である。

細胞質内に存在し、細胞内寄生菌のセンサーである自然免疫因子 Nod family は、自然免疫系だけでなく獲得免疫系の活性化の程度も規定し、免疫応答全般にきわめて重要である。これまで私どもは Nod family と疾患との関連の分子機構とシグナル伝達機構について解析を進めてきた。

#### (1) 疾患との関連

Nod2 の機能低下がクローン病を、逆に機能亢進が若年型サルコイドーシスを発症することを明らかにしてきた。これは自然免疫因子の異常と疾患発症の関連における最初の報告である。

#### (2) シグナル伝達機構

Nod2 に関して、多種の変異体を作製し、機能解析によってシグナル伝達機構を明らかにした。ここで疾患発症につながる変異を多く同定し、遺伝子診断パネルとして臨床診断に広く応用した。

#### (3) 活性制御因子の同定

NOD family に直接結合して活性を制御する因子として、癌抑制因子と活性酸素制御因子を同定している。

これまで自然免疫系のシグナル応答を制御する治療が試みられてきたが、対象となる因子が特定できていなかったため、分子機構に基づく有効な制御法が無い点が問題だった。さらに近年自然免疫因子を介した獲得免疫系の制御により、自己免疫能や抗腫瘍免疫能をコントロールする治療法が試みられているが、LPS 等の菌体成分を用いるため、臨床応用に適していなかった。

自然免疫系は、それぞれの自然免疫因子が相互に複雑なネットワークを形成して機能していると考えられる。

クローン病は自然免疫因子の欠損が病因である最初に報告された疾患であるが、病態生理については未だ不明な点が多い。肉芽腫形成疾患の解明には、自然免疫因子間相互作用の解明と自然免疫シグナル伝達系中のさらに多くの因子の同定とその解析が必須である。

### 2. 研究の目的

(1) Nod family の活性を制御する因子の機能を明らかにする。

(2) 新規治療法として自然免疫系の活性制御機構を開発する。

(3) 難治性肉芽腫形成疾患の発症機能を明らかにする。

(4) 自然免疫因子 NOD family と悪性腫瘍の発症との関連を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) 活性制御因子の NOD family との結合性と機能への影響を解析する。

(2) Nod family の活性制御機構を行う変異体を作製する。

(3) サルコイドーシスにおける免疫系の異常を明らかにする。

(4) 本法の特有の NOD family の遺伝子多型と疾患の関連を解析する。

### 4. 研究成果

(1) Nod family の活性を制御する因子の機能を明らかにする。

これまで NOD Like Receptors に直接結合して活性に影響する因子として同定している 2 種のがん抑制因子および 2 種の活性酸素制御因子について、NOD family との結合性を担う部位を変異体を用いて明らかにした。

この活性制御因子を安定して発現する細胞株を樹立し、NOD family が関連する細胞死への影響を解析した。活性制御因子の高発現下では、アドリアマイシン等の抗がん剤のアポトーシス誘導に対して、高い感受性を示した。

#### (2) 自然免疫系の活性制御法の開発

##### i) ドミナントネガティブ体の作製

NOD Like Receptors の活性制御を行うため、遺伝子変異導入によりドミナントネガティブ体を作製した。近年、自己炎症性疾患という概念が臨床で認知されはじめている。その概念に含まれる NOD2 関連疾患として、NOD2 過剰発現に起因する Blau 症候群（全身性肉芽腫形成疾患、若年性サルコイドーシス）の治療への応用が検討可能と考えた。

##### ii) 機能低下回復型変異体の作製

クローン病や消化器がんにおいて低下した NOD Like Receptors の活性を補充する変異体を作製した。野生型 NOD2 は大量発現させるとバックグラウンドが高くなり、リガンドの無い状態でも高活性を示す。このため、機能低下を補うために野生型 NOD2 を導入するためには厳密な発現調節が必要であり、現実的ではなかった。今回、大量発現してもバックグラウンドは高くない変異体を作製できた。このため、臨床応用への道が開けた。

#### (3) 臨床検体を用いたサルコイドーシスの発症機構の解析

サルコイドーシスの原因菌の同定と、発症機構について、臨床検体を用いた解析を行った。サルコイドーシスの病原菌として本邦ではアクネ菌が、欧米では結核菌が想定されている。今回、サルコイドーシス患者と健康人について、それぞれの菌に対する免疫応答を比較するために、末梢血での Th1 と TH17 サイトカインの活性を ELISPOT で、遺伝子発現量を RT-PCR で測定した。

アクネ菌に反応した IL-2 の産生はサルコイドーシス患者で高く、また IL-2 と IL-12

の mRNA の発現はサルコイドーシス患者で高かった。しかし IL-17 の mRNA の発現はサルコイドーシス患者の方が低かった。結核菌に対する応答性はサルコイドーシス患者と健康人で差がなかった。この結果、サルコイドーシスの病因として、アクネ菌に対する免疫応答不全による Th-1 と Th-17 のバランス異常を明らかにした。

従来、サルコイドーシスの原因菌として本邦ではアクネ菌が、欧米では結核菌の可能性が報告されてきた。実際にサルコイドーシス患者の検体を用いた本解析から、原因菌としてアクネ菌の可能性が高いことを示した。

#### (4) 本邦で認められる自然免疫因子の NOD2 遺伝子多型と疾患の関連

欧米で高頻度に認められる 3 種の NOD2 SNP は、本邦では認められない。本邦に特有の NOD2 SNP と疾患との関連を明らかにした (2011 Int. J. Hematology で報告)。

##### i) 骨髄性白血病

急性骨髄性白血病および慢性骨髄性白血病との関連を認めたが、リンパ急性白血病との関連は認めなかった。NOD2 は発生段階で、血液幹細胞から骨髄系の細胞への分化に関連する。この分化段階における NOD2 機能の異常が腫瘍性変化をもたらすことを初めて明らかにした。これまで NOD2 と悪性腫瘍の関連に関しては、大腸癌、肺癌、乳癌などの固形癌が報告されている。固形癌との関連については、NOD2 の機能低下による抗腫瘍免疫の低下が原因である。しかし本研究で明らかにした悪性腫瘍の発症機構は分化段階における異常に起因する最初の例である。この結果から、自然免疫系の機能として、発生における重要性も明らかにした。

さらにこれまで悪性腫瘍やクローン病との関連を示した NOD2 は NF- $\kappa$ B を指標とした場合には機能低下型変異だった。しかし本研究で解析した NOD2 SNP は、これまで自然免疫系の活性の指標としてきた NF- $\kappa$ B の変化は認めなかった。このため NOD2 による分化段階の制御については、NF- $\kappa$ B とは異なる分化シグナルによることを明らかにした。

##### ii) クローン病

本邦特有の NOD2 SNP とクローン病発症との関連について、部位別に解析したが、特に関連を認めなかった。クローン病の発症頻度は本邦では欧米と比較して低い。その原因の一つとして、本邦ではクローン病の発症と関連する NOD2 SNP が存在しないことを想定した (2011 Int. J. Hematology)。

##### iii) 移植片対宿主病 Graft versus Host Disease (GVHD)

欧米では NOD2 SNP が消化管での感染免疫能を規定することにより骨髄移植後の Graft versus Host Disease (GVHD) の重症度を規定

する因子として必須の検査項目になりつつある。本研究では、骨髄移植財団から臨床検体の提供を受けて、日本人集団での NOD2 SNP と GVHD の重症度について解析を行ったところ、欧米での報告とは逆に、防御的に作用する可能性を示した。(2011 Int. J. Hematology)。

#### 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 13 件)

1. Satoh F, Eishi Y, et al. Renal Sarcoidosis With Limited Lung Manifestations Expressing Propionibacterium acnes Anti -gens in the Affected Tubulointerstitium. Am J Med Sci. 査読有 2013 [Epub ahead of print]

2. Amodini Rajakaruna G, Eishi Y. et al. Possible translocation of periodontal pathogens into the lymph nodes draining the oral cavity. J Microbiol. 査読有 50, 2012, PP. 827-36.

3. Furusawa H, Eishi Y, et al. Th1 and Th17 immune responses to viable Propionibacterium acnes in patients with sarcoidosis. Respir Investig. 査読有 Vol. 50, 2012, PP. 104-109

4. Okamoto N, Eishi Y, et al. "Crawling-type" adenocarcinoma of the stomach: a distinct entity preceding poorly differentiated adenocarcinoma. Gastric Cancer. 査読有 Vol. 16, 2012, PP. 220-232.

5. Kondo Y, Tanabe T, et al. Association between feeling upon awakening and use of information technology devices in Japanese children. J Epidemiol. 査読有 Vol. 22, 2012, PP. 12-20.

6. Tanabe T, Yamaguchi N, et al. Association analysis of the NOD2 gene with susceptibility to graft-versus-host disease in a Japanese population. Int J Hematol. 査読有 Vol. 93, 2012, PP. 771-778.

7. Kondo Y, Tanabe T. et al.. Association between feeling upon awakening and use of information technology devices in Japanese children. Journal of Epidemiology 査読有 Vol. 22, 2012, PP. 12-20.

8. Tanabe T, Yamaguchi N, et al. The geography of cancer mortality in Japan focusing on pancreatic malignancies. Shimane Journal of Medical Science 査読有 Vol.28, 2011, PP.7-13.

9. Suita S, Tanabe T, et al. Epidemiologic studies on exercise, self-perception, and social interactions by the elderly -characterization of nonparticipating individuals in the care prevention project. Shimane Journal of Medical Science 査読有 Vol.28, 2011, PP.41-50.

10. Tanabe T, Yamaguchi N, et al. Association analysis of the *NOD2* gene with susceptibility to graft-versus-host disease in a Japanese population. International Journal of Hematology 査読有 Vol.93, 2011, PP.771-778.

11. Tanabe T, Yamaguchi N, Eishi Y, Fujita Y. The roles of NOD like receptors in inflammation are different between Japanese and Caucasian. The Inflammation and Regeneration 査読有 Vol.31, 2011, PP.196-201.

12. Yamaguchi N, Tanabe T, et al. Geographical analysis of pancreatic cancer mortality in Shimane Prefecture, Japan, 1985 to 2006. Shimane Journal of Medical Science 査読有 Vol.27, 2010, PP.9-16.

[学会発表] (計8件)

1. 田邊 剛、山口奈津、天野宏紀、三浦美樹子、藤田委由  
膵臓がん発症の危険因子について・地理的分布および他のがんととの関連の解析  
第22回日本疫学会学術総会 2012年1月27日 学士会館(東京)

2. 田邊 剛、山口奈津、天野宏紀、三浦美樹子、藤田委由  
膵臓がんの地理的分布および他のがんととの関連の解析による危険因子の同定  
第70回日本公衆衛生学会総会 2011年10月20日 秋田県民会館(秋田)

3. 田邊 剛、山口奈津、天野宏紀、三浦美樹子、藤田委由  
A geographic correlation study of the mortality of pancreatic and other cancers in Japan.  
第70回日本癌学会学術総会 2011年10月

5日 名古屋国際会議場(名古屋)

4. 田邊 剛、山口奈津、天野宏紀、三浦美樹子、藤田委由  
自然免疫因子 NOD like receptors の異常と GVHD の重症度の相関  
第84回日本生化学会総会 2011年9月24日 京都国際会館(京都)

5. 田邊 剛、伊永隆史、石橋康弘、有菌幸司、安田 寛、山口奈津、天野宏紀、三浦美樹子、近藤雄介、藤田委由  
毛髪ミネラル解析による化学物質を取り扱う教職員の金属曝露量の測定  
第84回産業衛生学会 2011年5月18日 ニューピアホール(東京)

6. 田邊 剛、伊永隆史、石橋康弘、有菌幸司、安田 寛、山口奈津、天野宏紀、三浦美樹子、近藤雄介、藤田委由  
化学物質を取扱う教育研究機関の教職員男性の金属曝露量の測定  
第21回日本疫学会学術総会 2011年1月21日 札幌道立道民活動センター(札幌)

7. 田邊 剛、山口奈津、天野宏紀、近藤雄介、藤田委由  
化学物質を取り扱う教職員の毛髪ミネラル解析による金属曝露量の測定  
第69回日本公衆衛生学会 2010年10月27日 東京国際フォーラム(東京)

8. Tanabe T, Yamaguchi N, Amano H, Miura M, Fujita Y.  
The roles of Nod like receptors in granulomatous diseases, inflammation, and carcinogenesis.  
14th international congress of immunology  
第14回国際免疫学会議 2010年8月23日 国際会議場(神戸)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田邊 剛 (TANABE TSUYOSHI)  
島根大学・医学部・准教授  
研究者番号: 80260678

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

江石 義信 (EISHI YOSHINOBU)  
東京医科歯科大学・医学部・教授  
研究者番号: 70151959