

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 11 月 5 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592689

研究課題名(和文) 網膜抗原特異的サイトカイン測定によるインフリキシマブ治療の適用、効果判定の検討

研究課題名(英文) Analysis of Th cell-related cytokine production in Behet's disease patients with uveitis before and after treatment with infliximab

研究代表者

竹内 大 (Takeuchi, Masaru)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・その他部局等・教授)

研究者番号：40260939

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：織抗原に対する炎症性サイトカインを含むThサイトカイン産生を解析し、その効果を検討すること。方法：対象は8名のぶどう膜炎を有するBD患者で、インフリキシマブ投与前、投与後1週目、および10名の健常者の末梢血を採取し、in vitroにて網膜特異抗原であるIRBPで48時間刺激後、その上清中のサイトカインを測定した。結果：ぶどう膜炎に関連するTh細胞関連サイトカインは、ぶどう膜炎を増悪させるものだけでなく寛解に働くサイトカインもインフリキシマブ治療により抑制されていた。しかし、BD患者におけるサイトカイン産生は、インフリキシマブ治療後も健常者より高値であった。

研究成果の概要(英文)：Purpose: To examine quantitative changes of cytokines produced by various Th cells specific for ocular tissue antigens before and after treatment with Infliximab (Inflix) in Behet's disease (BD) patients with uveitis. Methods: Eight BD patients with uveitis during treatment with infliximab were recruited in this study. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained before infusion of infliximab and at 1 week after the infusion. PBMCs were also obtained from 10 healthy subjects as the control. Each sample was cultured for 48 hrs with IRBP, and produced cytokines were measured by Bio-Plex kit. Results: It was indicated that cytokines produced by Th cells stimulated with IRBP in BD patients were suppressed by Inflix treatment, which was not only cytokines promoting ocular inflammation but also the inhibitory cytokines, but that the levels of most cytokines did not reach to those of healthy subjects.

研究分野：眼免疫

キーワード：ベーチェット病 ぶどう膜炎 Th細胞 Th17細胞

1. 研究開始当初の背景

ベーチェット病 (BD) は、眼、口、皮膚、生殖器、脈管および神経に病変を来す再発性慢性多臓器疾患である。眼には、両側性のブドウ膜炎を生じ、BD 患者の 60~80%にみられる。BD ブドウ膜炎は、増悪、自然寛解を繰り返す再発性炎症性発作によって特徴づけられ、繰り返す眼発作と進行性網膜血管炎により永続的な眼組織障害 (広範囲な網膜萎縮、黄斑症、視神経萎縮など) を呈する。以前より、Th1/Th2 アンバランス、Th1 細胞による自己免疫が BD の病因として指摘されているが、最近の研究により、IL-6、TNF- α 、および IL-17 を産生し、IFN- γ の産生はみられない Th17 細胞が Th1 細胞と同様に BD の発症に関与することが明らかになった。Zhao らは、活動性ブドウ膜炎を有する BD 患者からの末梢血リンパ球を採取し、S 抗原により刺激したところ、IL-2、IL-4、または IL-17 の産生は検出できなかったが、IFN- γ および TNF- α の産生がみられたことを報告した。我々も、BD 患者の末梢血単核細胞 (PBMCs) を光受容体間レチノイド結合蛋白質 (IRBP) および S 抗原 (S-Ag) により刺激し、IL-6、IL-10、IL-17、IFN- γ 、および TNF- α の産生量を測定したところ、IRBP 刺激による IL-6、IL-17、および IFN- γ の産生が健常対照者と比較して BD 患者で亢進していることを認めた。特に IRBP 刺激による IFN- γ 産生は、活動性ブドウ膜炎を有する BD 患者で有意に高かった。これまで BD ブドウ膜炎の治療には、コルヒチン、副腎皮質ステロイド、シクロスポリンなどの免疫調節薬が用いられてきたが、治療に奏功せず重症な不可逆性の視力障害に至る症例も少なくはなかった。しかし、生物製剤を用いた分子標的療法が BD ブドウ膜炎の治療にも用いられるようになり、その視力予後は大きく改善されつつある。インフリキシマブは可溶性および膜結合型の TNF

する高親和性キメラ IgG1 モノクローナル抗体であり、TNF と受容体との結合を阻害する。そしてこれまでの様々な研究により、難治性 BD ブドウ膜炎におけるその有効性が示されている。

2. 研究の目的

今回我々は、インフリキシマブ治療中の BD 患者における PBMCs の IRBP 刺激に対する Th1 および Th17 サイトカインをインフリキシマブ投与前後で測定し、その抑制効果を免疫学的に解析するとともに、インフリキシマブ治療の定量的評価判定を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 対象

2014 年 1 月から 12 月の間に防衛医科大学校病院眼科に通院し、インフリキシマブ治療を受けている 8 症例の BD 患者、および 10 例の健常人を対象とした。BD の診断は、国際ベーチェット病研究グループが定めた診断基準に則り施行された。平均年齢は BD 患者が 38.3 ± 9.1 歳 (範囲 16-51 歳)、健常者が 34.6 ± 7.6 歳 (範囲 28-49 歳)、男女比は BD 患者 7:1、健常者 7:3 であり、年齢および性差に有意差はみられなかった。BD 患者におけるインフリキシマブ治療期間の中間値は 26.9 ± 21.9 ヶ月であり、すべての患者は 1 年以上のインフリキシマブ治療を施されていた。本研究プロトコールは、ヘルシンキ宣言に誓い、防衛医科大学校内倫理委員会が承認したものであり、書面でのインフォームドコンセントをすべての関与している患者および対照者から得ている。

2) IRBP

ブタ網膜を 0.03M の PBS (pH 7.6) にホモジェナイズ後、遠心 (10 分間の 48,000g) し、その上澄みを採取。飽和硫酸 (pH 7.2) を加え、50% に飽和させ、さらに遠心分離

後、その沈殿物を PBS に融解させ、Con A-セファロース・アフィニティークロマトグラフィーとイオン交換高性能液体クロマトグラフィにより IBBP を精製した。

3) PBMCs の採取

20ml の PBMCs を BD 患者からはインフリキシマブの注入前、そして注入 1 週後、健常者からは任意時にヘパリン添加管に採血した。フィコール®を用いた密度勾配遠心沈殿法により単核球を分離し、 2×10^6 個/mL の濃度に調整後、10mM の HEPES, 0.1 mM 必須アミノ酸, 1 mM ナトリウム・ビルピン酸, 100 U/mL ペニシリン, 100 μ g/mL ストレptomycin, 1×10^{-5} M 2-ME, そして 10%胎仔牛血清を添加した RPMI1640 に種々の濃度の IRBP を加え培養を行った。

4) サイトカイン測定

培養開始後 48 時間目に培養上清を採取し、上清中の IL-1、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17A、IL-17F、IL-21、IL-22、IL-25、IL-31、IL-33、IFN- γ 、可溶性 CD40 配位子 (sCD40L)、および TNF を Bio-Plex Beads Array Th17 サイトカイン測定 kit®を用いて測定した。

5) 統計解析：

連続変数の 2 群間比較はマンホイットニーの U 検定、3 群間は **スティール・ドクス** 検定、文字変数には χ^2 検定を用い、 $P < 0.05$ を有意とした。

4. 研究成果

ベーチェット病患者と健常対照者間の T 細胞活性化マーカーと炎症性サイトカインの比較

可溶性 CD40 リガンド (sCD40L) は活性化した主に Th1 細胞から産生され、IL-1、IL-6 は自然免疫において作用するマクロファージや好中球、樹枝状細胞などから産生され、活性化 T 細胞との相互作用により、その産生はさらに増加する。我々は以

前に、健常者の PBMCs を IRBP で刺激すると IRBP 反応性 T 細胞が活性化され、サイトカイン産生がみられることを示したが、IRBP 刺激による PBMCs の sCD40L 産生量はインフリキシマブ注入前の BD 患者と健常対照者間でほぼ同等であった。インフリキシマブ注入後、BD 患者の PBMCs による sCD40L 産生は低下したが、インフリキシマブ注入前後における統計学的有意差はみられなかった。一方は、IRBP 刺激による PBMCs の IL-1 および IL-6 の産生量は、健常者と比較してインフリキシマブ注入前の BD 患者で高く、特に IL-1 の産生量は、IRBP 5 μ g/ml 刺激において有意差が見られた。インフリキシマブ注入後、BD 患者の PBMCs による IL-1 および IL-6 産生は減少したが、健常者よりも高く、インフリキシマブ注入前後における統計学的有意差はみられなかった。

ベーチェット病患者と健常対照者間の Th1 および Th17 細胞関連サイトカインの比較

Th1 および Th17 細胞はぶどう膜炎の発症に関与することが、実験的自己免疫性ぶどう膜炎 (experimental autoimmune uveoretinitis: EAU) をはじめとする内因性ぶどう膜炎の動物モデルにおいて認められ、ヒトぶどう膜炎においても Th1 細胞、Th17 細胞の活性化が報告されている。Th1 サイトカインである IFN- γ 、マクロファージや好中球、樹枝状細胞の他、Th1 および Th17 細胞からも産生される TNF は、健常対照者の IRBP 刺激による PBMCs の産生量と比較してインフリキシマブ注入前の BD 患者で高く、TNF 産生においては有意差がみられた。BD 患者の IRBP 刺激による PBMCs の IFN- γ および TNF 産生は、インフリキシマブ注入後に減少したが、健常者のそれらより以前高く、インフ

リキシマブ注入前と比較しても有意差はなかった。Th1 サイトカインとして同様に、IRBP 刺激による PBMCs の Th17 サイトカイン、IL-17A、IL-17F、IL-21 および IL-22 の産生量は、健常者よりインフリキシマブ注入前の BD 患者で高く、IL-17F と IL-22 産生においては有意差がみられた。ベージェット病患者と健常対照者間の Th1 および Th17 細胞関連サイトカインの比較

IL-4、IL-10、および IL-31 は Th2 サイトカインであり、IL-10 は regulatory T (T reg) 細胞によっても産生される。ブドウ膜炎における IL-31 の作用はわかっていないが、IL-4 および IL-10 はブドウ膜炎の発症を抑制することが知られている。しかし想定外に、IRBP 刺激による PBMCs の IL-4、IL-10 および IL-31 産生は健常対照者と比較してインフリキシマブ注入前の BD 患者で高く、5 µg/ml の IRBP 刺激では IL-10 産生に有意差がみられた。BD 患者におけるこれら Th2 サイトカインの産生は、インフリキシマブ注入後に減少し、IL-4 および IL-10 の産生量は健常者と同程度であった。

PBMCs が産生する Th サイトカインの中で BD ぶどう膜炎の活動性と最も関連するサイトカインを同定すること、また精製困難な IRBP の代わりとなる抗原の検索など、さらなる研究が必要であるが、本研究結果より、BD 患者において網膜特異抗原刺激による PBMCs の Th 細胞関連サイトカイン産生を測定することは、BD ぶどう膜炎に対するインフリキシマブ治療の中止を決定する 1 つのツールになり得るかもしれない。

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 20 件)

1. Ohguro N, Sonoda KH, Takeuchi M, Matsumura M, Mochizuki M:

The 2009 prospective multi-center epidemiologic survey of uveitis in Japan. Japanese Journal of Ophthalmology 56(5), 432-435. 2012

2. Takayama K, Enoki T, Kojima T, Ishikawa S, Takeuchi M:

Treatment of peripheral exudative hemorrhagic chorioretinopathy by intravitreal injections of ranibizumab. Clinical Ophthalmology 6, 865-869. 2012

3. Takeuchi M, Takayama K, Sato T, Ishikawa S, Fujii S, Yutaka S:

Non-aspiration technique to induce posterior vitreous detachment in minimum incision vitrectomy system. British Journal of Ophthalmology 96(11), 1378-1379. 2012

4. Takayama K, Sato T, Karasawa Y, Sato S, Ito M, Takeuchi M:

Phototoxicity of Indocyanine Green and Brilliant Blue G under Continuous Fluorescent Illumination on Cultured Human Retinal Pigment Epithelial Cells. Investigative Ophthalmology and Visual Science 53(11), 7389-7394. 2012

5. Takeuchi M:

A systematic review of biologics for the treatment of noninfectious uveitis. Immunotherapy 5 (1), 91-102. 2013

6. Takayama K, Ishikawa S, Enoki T, Kojima T, Takeuchi M:

Successful treatment with infliximab for Behçet disease during pregnancy. Ocular Immunology and Inflammation 21(4), 321-323. 2013

7. Shoji T, Sato H, Mizukawa A, Hirota N, Enoki T, Kojima T, Kanda T, Takeuchi M:

Hypotensive effect of latanoprost/timolol versus travoprost/timolol fixed combinations in NTG patients: a randomized, multicenter, crossover clinical trial. Investigative Ophthalmology and Visual Science 54(9), 6242-7. 2013

8. Takayama K, Usui Y, Ito M, Goto H, Takeuchi M:

A case of sebaceous adenoma of the eyelid showing excessively rapid growth. Clinical Ophthalmology 7, 667-70. 2013

9. Kato N, Konomi K, Saiki M, Negishi K,

Takeuchi M, Shimazaki J, Tsubota K:
Deep stromal opacity after corneal cross-linking. *Cornea* 32(7), 895-8. 2013

10. Sugita S, Ogawa M, Shimizu N, Morio T, Ohguro N, Nakai K, Maruyama K, Nagata K, Takeuchi M, Mochizuki M:
Use of a Comprehensive Polymerase Chain Reaction System for Diagnosis of Ocular Infectious Diseases. *Ophthalmology* 120(9)/1761-1768, 2013

11. Takayama K, Fujii S, Ishikawa S, Takeuchi M:
Short-Term Outcomes of Coaxial Microincision Cataract Surgery for Uveitis-Associated Cataract without Postoperative Systemic Steroid Therapy. *Ophthalmologica* 231(2), 111-6. 2014

12. Sato T, Minakuchi S, Mochizuki M, Takeuchi M:
Acute anterior uveitis after discontinuation of tocilizumab in a patient with rheumatoid arthritis. *Clinical Ophthalmology* 8, 187-90, 2014

13. Harimoto K, Ito M, Karasawa Y, Sakurai Y, Takeuchi M:
Evaluation of mouse experimental autoimmune uveoretinitis by spectral domain optical coherence tomography. *British Journal Ophthalmology* 98(6), 808-12. 2014

14. Kanda T, Shibata M, Taguchi M, Ishikawa S, Harimoto K, Takeuchi M:
Prevalence and aetiology of ocular hypertension in acute and chronic uveitis. *British Journal Ophthalmology* 98(7), 932-6. 2014

15. Takeuchi M, Kezuka T, Sugita S, Keino H, Namba K, Kaburaki T, Maruyama K, Nakai K, Hijioka K, Shibuya E, Komae K, MD, Hori J, Ohguro N, Sonoda K, Mizuki N, Okada A, Ishibashi T, Goto H, Mochizuki M:
Evaluation of long-term efficacy and safety of infliximab treatment for uveitis in Behçet's disease: a multicenter study. *Ophthalmology* 121(10), 1877-84. 2014

16. Ishikawa S, Taguchi M, Muraoka T, Sakurai Y, Kanda T, Takeuchi M:
Efficacy of subfoveal choroidal thickness measurement for monitoring uveitis activity in BD patients. *British Journal of Ophthalmology* 98(11), 1508-13. 2014

17. Agawa T, Usui Y, Wakabayashi Y, Okunuki Y, Juan M, Umazume K, Kezuka T, Takeuchi M, Yamauchi Y, Goto H: Profile of intraocular immune mediators in patients with age-related macular degeneration and the effect of intravitreal bevacizumab injection. *Retina* 34(9), 1811-8. 2014

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 大 (TAKEUCHI, Masaru)
防衛医科大学校・その他の部局等・教授
研究者番号: 4 0 2 6 0 9 3 9

(2) 研究分担者

櫻井 裕 (SAKURAI Yutaka)
防衛医科大学校・その他の部局等・教授
研究者番号: 0 0 2 3 5 2 2 7

唐澤 容子 (KARASARA Yoko)
防衛医科大学校・その他の部局等・助教
研究者番号: 6 0 5 3 5 5 4 0

播本 幸三 (HARIMOTO Kozo)
防衛医科大学校・その他の部局等・助教
研究者番号: 8 0 6 2 6 8 0 4