

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461511

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

研究課題名(英文) The development of the controlling system for innate immune activity: a new treatment development of refractory granuloma formation disease.

研究代表者

田辺 剛 (TANABE, Tsuyoshi)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80260678

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：サルコイドーシス発症と、自然免疫因子複合体インフラマソーム因子(NLRP1、NLRP2、NLRP3)の遺伝子多型との関連を明らかにした。肉芽腫形成疾患の発症に関与することが想定されるインフラマソーム構成因子(NLRP3、NLRP1、ASC、Caspase-1)、自然免疫因子TLR4、抗酸化因子(Catalase、Heme-oxygenase)の発生段階での臓器別に異なる発現変化と、臨床症状の変化との関連を示した。アクネ菌のカタラーゼタンパクはサルコイドーシスにおいてTh1免疫応答を誘導することを明らかにした。また前立腺がんの発症にアクネ菌の感染が関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We revealed an association between sarcoidosis onset and genetic polymorphism of the inflammasome, innate immunity factor complex (NLRP1, NLRP2, NLRP3). We clarified the association between the change of clinical symptoms and expression change in the developmental stage of following factors; inflammasome factors involved in the pathogenesis of granuloma formation disease (NLRP3, NLRP1, ASC, Caspase-1), innate immune factor TLR4, anti-oxidation factor (Catalase, Heme-oxygenase). Catalase protein of *P. acnes* was revealed to induce Th1 immune response in sarcoidosis patients. We also clarified that the infection of *P. acnes* participated in the onset of prostate cancer.

研究分野：分子予防医学

キーワード：自然免疫 肉芽腫形成疾患 インフラマソーム

## 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。しかし発症要因は不明であり、有効な治療法も確立していない。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急務である。これまで私どもは肉芽腫形成疾患の発症に関与する機構として、自然免疫系の解析を進めてきた。中でも細胞質内に存在し、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、免疫応答全般の強度を規定する。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) 肉芽腫形成疾患との関連

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。さらにサルコイドーシスの発症機構が、細胞内寄生性のアクネ菌に対する変異型 NOD1 の応答以上に依ることを報告した。

### (2) 自然免疫系のシグナル伝達機構

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) 自然免疫系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。

また変異体を多数作成し、ドミナントネガティブ体や、大量発現しても応答性は維持して非特異的反応は起こりにくいタイプを作成し、治療への応用の可能性を探索してきている。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ため、肉芽腫形成疾患は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) 自然免疫系の異常と肉芽腫形成疾患の関連

難治性肉芽腫形成疾患の代表的疾患であるサルコイドーシスの発症について、細胞質内に局在する自然免疫因子の遺伝子多型との関連を解析した。

### (2) 自然免疫系の発達段階での発現変化と臨床症状の関連

クローン病やサルコイドーシス等の肉芽腫形成疾患は加齢に伴う症状の変化が報告されているため、加齢に伴う自然免疫系遺伝子発現の変化が病態に影響することが想定される。このため発達段階での自然免疫関連遺伝子の発現を解析することで、肉芽腫形成疾患の病態解明と新規治療法開発に結びつけることを目的とした。

### (3) 肉芽腫形成疾患発症の免疫抗原の解析

サルコイドーシスの原因菌であるアクネ菌が免疫系を刺激して発症に至る機構を解明するために、アクネ菌の菌体成分の中で特に疾患特異的に免疫応答異常を示すものを同定することを目的とした。

### (4) 発癌との関連

肉芽腫形成疾患の原因菌であるアクネ菌と発癌との関連を解析することにより、発癌における慢性炎症の関与を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 自然免疫系の異常と肉芽腫形成疾患の関連

日本人集団における自然免疫能に影響する NLRP 遺伝子多型を含む、4 種類の遺伝子多型を解析した。NLRP1、NLRP2、NLRP3 の内、計 4 種の遺伝子多型について、健常人群とサルコイドーシス群での比較を行った。

### (2) 自然免疫系の発達段階での発現変化と臨床症状の関連

生後 3 ヶ月と 8 ヶ月のマウス(青年期と老年期に相当)の肝臓、肺、リンパ節、脾臓、骨髄、腹腔リンパ節の各臓器から mRNA を抽出し、RT-PCR 法により遺伝子発現量を比較定量した。

### (3) 肉芽腫形成疾患発症の免疫抗原の解析

53 人のサルコイドーシス罹患者と 34 人の健常人コントロールを対象とした。アクネ菌の菌体成分を患者血清との免疫学的応答性を指標にスクリーニングし、同定した抗原タンパクを MALDI-TOF/MS で解析した。

### (4) 発癌との関連

前立腺がん組織におけるアクネ菌の存在を免疫学的に解析した。特にアクネ菌に対する新しいモノクローナル抗体を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) 自然免疫系の異常と肉芽腫形成疾患の関連

健常人群とサルコイドーシス群での比較を行った。特に NLRP3 について関連する傾向を認めただものの、p 値で 0.05 以下を示した遺伝子多型は無かった。以上の結果から、

サルコイドーシスの発症と関連する自然免疫因子に関して、細胞質内に局在するタイプの内、NOD1は関連し、インフラマソーム関連因子であるNLRPは関連性が低いことを明らかにした。このことはサルコイドーシスの病院において、原因菌であるアクネ菌に応答してアポトーシスを誘導するNOD1の経路の方が、炎症を誘導するインフラマソームの経路よりも発症に影響することが示唆された。このことはサルコイドーシスの病院において、原因菌であるアクネ菌に応答してNF- $\kappa$ Bを産生するNOD1の経路の方が、IL-1やIL-18を産生するインフラマソームの経路よりも発症に影響することを示唆する。サルコイドーシスの発症に関連するNOD1の遺伝子多型については、機能が約50%低下することをこれまでに報告している。今回解析したNLRP3の遺伝子多型については、これまで機能亢進型の機能変化をもたらす、食物アレルギーとアスピリン喘息の発症に関与し、日本人の免疫能に影響することが報告されている。NOD1とNLRP3は同じ細胞質内の自然免疫因子であるが、NOD1がアポトーシスの誘導に関与するのに対し、NLRP3は炎症の誘導に関与している。この結果からサルコイドーシスの発症機序は、細胞内に浸潤するアクネ菌に対して、通常はNOD1が十分に応答して感染細胞にアポトーシスを誘導することにより感染の拡大を防御しているが、NOD1が機能低下を示す場合には、感染細胞に対して十分なアポトーシスを誘導することができず、アクネ菌が増殖し、その過剰に増殖したアクネ菌に対し、NOD1以外の免疫因子が過剰に活性化されて細胞性免疫応答が過剰になり、サルコイドーシスの病変を形成する可能性が示唆された。

#### (2) 自然免疫系の発達段階での発現変化と臨床症状の関連

加齢に伴って遺伝子発現低下を示したものが多かったが、逆に増加を示す遺伝子群も認められ、複雑な遺伝子発現制御機構が存在することが示唆された。特に免疫複合体インフラマソームを形成する3種の因子であるASC、Caspase-1、NLRPについては、特に協調的な遺伝子発現を認めなかった。自然免疫群で大きく2群を形成するToll like receptor群とNOD like receptor群は特に協調的な挙動は示さなかった。この解析から、肉芽腫形成疾患の加齢に伴う症状の変化が自然免疫系遺伝子の発現変化に依る可能性を明らかにした。今後は変化した遺伝子発現を補正することにより、新規治療法開発に結びつけることを検討する。

#### (3) 肉芽腫形成疾患発症の免疫抗原の解析 同定したタンパクを大量発現させ、アクネ菌で感作したマウスのリンパ節細胞に対す

る応答性をELISPOT IFN- $\gamma$  assayで解析したところ、Catalaseで特異的な免疫応答を確認した。臨床検体を用いた解析でもサルコイドーシス群で有意に高い抗体価を認めた。この結果、肉芽腫形成疾患の発症における免疫異常を誘導する抗原が明らかになり、発症機構の解明及び治療法の開発に応用できる。

#### (4) 発癌との関連

前立腺の各組織における詳細な解析により、癌部において非癌部よりもアクネ菌の存在を認める率が明らかに高かった。この結果、菌体によって引き起こされた慢性炎症が発癌に寄与する可能性を示した。発癌とウイルス感染の関連に関する報告は多いが、細菌感染との関連を示す報告は少ない。アクネ菌に対する免疫応答異常が肉芽腫形成疾患の発症をもたらす機構に加え、発癌の機構の解明は、新しい発癌メカニズムの解明につながる可能性がある。

#### 5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計18件)

Kobayashi-Miura M, Tanabe T (8人中6番目), Rat Articular Cartilages Change Their Tissue and Protein Compositions During Perinatal Period., *Anatomia Histologia Embryologia* 査読有, vol.45, 2016, 9-18. doi: 10.1111/ahel.12165.

Numakura T, Eishi Y, Ichinose M. [12人中11番目] Simultaneous development of sarcoidosis and cutaneous vasculitis in a patient with refractory Crohn's disease during infliximab therapy. *BMC Pulm Med.* 査読有, vol.11, 2016, 16:30. doi: 10.1186/s12890-016-0193-5.

田辺剛、山口奈津、高橋秀和、環境汚染物質と免疫関連疾患、*日本衛生学雑誌*、査読有、70巻、2015年、p.115-119、URL: <http://ci.nii.ac.jp/naid/130005070848>

Amano H, Tanabe T [7人中3番目] Factors Associated With Cognitive Impairment From Investigation in Aged 60 and Older Community of a Town in Shimane Prefecture, *Shimane Journal of Medical Science*, 査読有, vol.31, 2015, 43-51 URL: <http://ci.nii.ac.jp/naid/110009911156>

Yorozu P, Eishi Y. [13人中13番目] Propionibacterium acnes catalase induces increased Th1 immune response in sarcoidosis patients. *Respir Investig.* 査読有, vol. 53(4):2015, 161-9. doi: 10.1016/j.resinv.2015.02.005.

Minegishi K, Eishi Y. (9人中9番目) Genetic profiles of Propionibacterium acnes

and identification of a unique transposon with novel insertion sequences in sarcoid and non-sarcoid isolates. *Sci Rep.* 査読有、vol.12、2015、;5:9832. doi: 10.1038/srep09832.

Omori M, Eishi Y ( 6 人中 5 番目 ) Systemic sarcoidosis with bone marrow involvement showing *Propionibacterium acnes* in the lymph nodes. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 査読有、vol. 29(10)、2015:2059-60. doi: 10.1111/jdv.12594.

Bae Y, Eishi Y. ( 11 人中 11 番目 ) Intracellular *Propionibacterium acnes* infection in glandular epithelium and stromal macrophages of the prostate with or without cancer. *PLoS One.* 査読有、vol.28、2014、9(2):e90324. doi: 10.1371/journal.pone.0090324. eCollection 2014.

Takemori N, Eishi Y. ( 4 人中 4 番目 ) Successful treatment in a case of *Propionibacterium acnes*-associated sarcoidosis with clarithromycin administration: a case report. *J Med Case Rep.* 査読有、vol.8、2014、8:15. doi: 10.1186/1752-1947-8-15.

Oono T, Yamasaki T, Tanabe T. Association of tyrosine with insulin resistance in hepatitis C virus-related chronic liver disease. *Hepatol. Res.* 査読有 vol.44, 2014, 54-62

田邊 剛、自然免疫システムの異常と疾患、*山口医学*、vol.63, 2014, 5-10 査読有  
URL : <http://doi.org/10.2342/ymj.63.5>

McDowell A, Eishi Y ( 5 人中 5 番目 ) *Propionibacterium acnes* in human health and disease. *Biomed Res Int.* 査読有、2013;2013:493564. doi: 10.1155/2013/493564.

田邊剛、山口奈津、免疫系の異常と生活習慣病、*日本予防医学会雑誌*、vol.8, 2013, 99-104 査読無し

Eishi Y.、Etiologic aspect of sarcoidosis as an allergic endogenous infection caused by *Propionibacterium acnes*. *Biomed Res Int.* 査読有、2013;2013:935289. doi: 10.1155/2013/935289.

Eishi Y.、Etiologic link between sarcoidosis and *Propionibacterium acnes*. *Respir Investig.* 査読有、2013 Jun;51(2):56-68. doi: 10.1016/j.resinv.2013.01.001.

Asahina A, Eishi Y. ( 6 人中 6 番目 ) Cutaneous sarcoidosis with livedoid lesions: evidence of the involvement of

*Propionibacterium acnes*. *J Dermatol.* 査読有、2013 Jun;40(6):501-2. doi: 10.1111/1346-8138.12120.

Satoh F, Eishi Y ( 6 人中 5 番目 ) Renal sarcoidosis with limited lung manifestations expressing *Propionibacterium acnes* antigens in the affected tubulointerstitium. *Am J Med Sci.* 査読有、vol. 346(3)、2013:250-2. doi: 10.1097/MAJ.0b013e31828bdf9f.

Minegishi K, Eishi Y. ( 12 人中 12 番目 ) Complete Genome Sequence of a *Propionibacterium acnes* Isolate from a Sarcoidosis Patient. *Genome Announc.* 査読有、2013、1(1). pii: e00016-12. doi: 10.1128/genomeA.00016-12.

〔学会発表〕(計4件)

三浦美樹子、田邊剛、S 大学解剖学実習に供された篤志献体者の膝関節軟骨の剖検と疫学的調査(2012-2015)、第 121 回日本解剖学会総会、2016 年 3 月 28 日、ビッグパレットふくしま(福島県郡山市)

田邊剛、環境汚染物質と免疫関連疾患、第 84 回日本衛生学会学術総会シンポジウム、2014 年 5 月 26 日、岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)

田邊剛、山口奈津、難治性免疫関連疾患の発症における自然免疫因子 NOD family の遺伝子変異、第 87 回日本産業衛生学会、2014 年 5 月 24 日、岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)

田邊剛、山口奈津、膵臓がんの危険因子の推定 - 地域分布および他の喫煙関連がんとの相関、第 87 回日本産業衛生学会、2014 年 5 月 24 日、岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)

〔図書〕(計1件)

田邊剛、山口奈津 他、日本予防医学会、予防医学指導士テキスト(1. 予防医学と疾病 8 . がん)、2016 年、231(52-59)

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

田邊 剛 (TANABE , Tsuyoshi )  
山口大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号 : 8 0 2 6 0 6 7 8

### (2) 研究分担者

山口 奈津 (YAMAGUCHI , Natsu )  
山口大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号 : 4 0 4 5 0 6 7 1

### (3) 連携研究者

江石 義信 (EISHI , Yoshinobu )

東京医科歯科大学・病理学・教授  
研究者番号：70151959