

図3 ぶどう膜炎の罹病期間と内服治療

罹病期間が5年未満の症例ではシクロスポリンが中心で、罹病期間が5年以上の症例ではコルヒチンの占める割合が高くなっていった。また罹病期間が10年以上の症例では全身治療の割合が減少していた。

[考按]

従来ベーチェット病患者の性比はやや男性に多いとされてきたが、最近ではその差がなくなり、複数の施設で女性患者数の比率の増加が指摘されている。また、病型は不全型が多いと報告されている(4)(5)(6)。横浜市大眼科を受診した患者についても同様の結果が得られた。ただし、眼症状を有する症例は男性に多く、眼科において男性患者が問題となることは変わらない。本症の患者数は、近年減少傾向にあるという報告があるが(4)(5)(6)(7)(8)、今回我々の調査結果では、年別初診患者数には増加あるいは減少傾向はみられなかった。また、ぶどう膜炎の平均発症年齢は20歳代から30歳代へと上昇傾向にあるとされているが(9)、当科においても平均発症年齢は30歳代であり、また女性の方が発症がやや遅かった。

ぶどう膜炎に対する内服治療は、我々の施設では、ぶどう膜炎の発作を繰り返す症例には原則としてコルヒチン1mg/dayから開始し、症状に応じて2mg/day程度まで増量しているが、炎症の頻度、程度に改善がみられない場合はコルヒチンからシクロスポリン5mg/Kg/dayにきりかえたり、あるいは両者の併用を行っている。また、重篤な網膜ぶどう膜炎の発作を繰り返す症例に対しては、初回導入時からシクロスポリンを用いている。今回の調査結果では、ぶどう膜炎の内服治療の中心は、罹病期間に伴いシクロスポリンからコルヒチンに推移した。また、罹患年数が10年以上経過した症例では全身治療の割合

が減少していた。この理由としては、眼症状は発症後5年くらいの間に非常に活発な発作を起こすことが多く、その後は徐々に発作も少なくなり、約10年くらいで鎮静化して行くことが多い³⁾¹⁰⁾¹¹⁾ためと思われた。

ベーチェット病は、難治性ぶどう膜炎による視力予後不良な疾患であり、眼科通院も長期にわたるが、疫学的背景をもとに、個々の症例の治療方針と予後の予想をしっかりとたてて治療にあたる必要がある。ぶどう膜炎に対する内服治療に関しては、従来からさまざまな報告があるがいまだ確立されていない¹³⁾。発作時の消炎のみならず再発をできるだけ抑制するために、現在我が国では第一選択としてコルヒチンが用いられることが多い¹⁾¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾が、我々の施設も、内服治療の中心はコルヒチンであり、難治例や重症例にはシクロスポリンを使用している。難治例に対しシクロスポリンが導入されるようになり、視力予後は改善している¹⁾⁵⁾¹³⁾¹⁴⁾との報告もあるが、重篤な副作用や効果減弱などの問題点があるため、いたずらに長期使用はすべきでないと思われる。また、いずれも副作用を伴うものであるため、患者に対する疾患の説明や使用する薬剤の説明を行うことにより、患者の同意を得るのはいうまでもなく、十分注意して経過観察していく必要があると思われる。

[参考文献]

- 1) 安藤一彦, 沼賀二郎: ベーチェット病の診断と治療. 眼科 38: 1139-1145, 1996.
- 2) 湯浅武之助: ベーチェット病の疫学と臨床統計. 眼科 33: 225-232, 1991.
- 3) 鎌田光二: ベーチェット病. あたらしい眼科 8: 1185-1189, 1991.
- 4) 安吉弘毅, 砂川光子, 大平明弘, 田辺昌代, 吉田宗徳, 沖波 聡: 1970年から1992年の間の京大ぶどう膜炎外来におけるベーチェット病患者の推移. 臨眼 48: 67-70, 1994.
- 5) 安藤一彦, 藤野雄次郎, 土方清乃, 伊沢志穂, 増田寛次郎: ベーチェット病の臨床像—疫学的特徴と視力予後—. 日眼 101: 814-818, 1997.
- 6) 大野重昭, 井上豊乃, 鎌田光二: 横浜市立大学におけるベーチェット病の臨床的観察. 厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班平成元年度研究業績集, 15-16, 1990.
- 7) 小竹 聡, 笹本洋一, 古館直樹, 合田千穂: 北大眼科における最近のベーチェット病の動向. 厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班平成4年度研究業績集, 157-159, 1993.
- 8) 大野重昭, 大口正樹, 有門卓二, 松田英彦, 杉浦清治: ベーチェット病患者の臨床疫学的研究. 厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班昭和55年度研究業績集, 204-208, 1981.
- 9) 湯浅武之助, 高木敬之, 中川やよい, 多田 玲, 谷口永津, 春田恭照: 最近受診したベーチェット病患者の実態. 厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班昭和60年度研究業績集, 39-42, 1986.
- 10) 小暮美津子: ベーチェット病の診断. 眼科 33: 239-248, 1991.
- 11) 東田みち代, 中川やよい, 多田 玲, 笹部哲生, 藤井節子, 春田恭照, 湯浅武之助: 1990(平成2)年におけるベーチェット病の現況. 眼紀 42: 1014-1018, 1991.
- 12) 永富絵美, 門野裕子, 徳田和央, 原 里佳, 氏原 弘, 稲葉午朗, 宮永嘉隆: ベーチ

ェット病に対するコルヒチン, シクロスポリン A および FK506 使用の比較検討. 臨眼 48 : 279-282, 1994.

13) 三宅睦子, 砂川光子, 沖波 聡 : 10 年以上経過観察できたベーチェット病. 眼紀 48 : 707-712, 1997.

14) 呉 朋子, 小暮美津子, 高橋義徳, 杉村光子, 霜村三季, 八木郁子, 八代成子, 吉川三花 : シクロスポリン導入後のベーチェット病眼症. 眼紀 48 : 809-813.

15) 北沢万里子, 沼賀二郎, 藤野雄次郎, 林 清文, 伊沢保穂, 増田寛次郎 : ベーチェット病のシクロスポリンとコルヒチンの併用療法. 臨眼 48 : 1401-1404, 1994.

EAUにおけるリンパ球接着分子の検討

大野 重昭 (横浜市立大学医学部,眼科)
鳥山 聖子 (横浜市立大学医学部,眼科)
中村 聡 (横浜市立大学医学部,眼科)
杉田 美由紀 (横浜市立大学医学部,眼科)
今井 由美 (横浜市立大学医学部,眼科)

KEYWORD= 実験的自己免疫性網膜ぶどう膜炎,接着分子, L-selectin, LFA-1,
ベーチェット病

[目的]実験的自己免疫性網膜ぶどう膜炎 (EAU) の発症過程におけるリンパ球細胞表面の接着分子発現率の変動を検討する。 [方法] 合成ペプチドR14を抗原とし、Lewisラットを用いてEAUを作成した。経時的にラットから脾臓を摘出し、リンパ球を分離した。 蛍光標識抗体を用いてリンパ球を染色し、フローサイトメータでCD4、L-selectin、LFA-1の発現率を解析した。 [結果] CD4陽性細胞におけるL-selectinの発現率は、免疫後6日目までは軽度増加し、EAU発症直前の8日目に急激に減少した。その後10日目には再び増加し、0日群と同程度の発現率に戻った。一方、LFA-1の発現率は、EAUの発症期の10日目から増加を始め、15日目にかけて有意に上昇し、22日目に減少した。 [結論] EAUではL-selectin、LFA-1ともにリンパ球の活性化に伴いその発現率に変動がみられたが、変動時期がそれぞれ異なり、発症における各接着分子の役割の違いが示唆された。

Lymphocyte Adhesion Molecules on Experimental Autoimmune Uveoretinitis in Rats

Shigeaki Ohno, Satoko Toriyama, Satoshi Nakamura, Miyuki Sugita, Yumi Imai
(Department of Ophthalmology, Yokohama City University School of Medicine)

[Purpose] We investigated lymphocyte adhesion molecules during the progression of experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) in rats.[Methods]A synthesized R14 was used as an antigen to induce EAU in Lewis rats. Spleen lymphocytes were isolated from rats several times through the development of EAU. The lymphocytes were stained with anti-rat monoclonal antibodies, and the expressions of surface antigens, CD4, L-selectin and LFA-1 were analyzed by flow cytometer. [Results] The proportion of L-selectin+CD4+ lymphocytes gradually increased up to day 6, then suddenly decreased at day 8 when was just before EAU onset, and once again began to increase at day 10 and recovered to almost the same proportion as day 0 group. The proportion of LFA-1+CD4+ lymphocytes began to increase significantly from day 10 to day 15 when was the effector phase and then decreased at day 22. [Conclusions]It was revealed that the expressions of these adhesion molecules of spleen CD4+ lymphocytes varied markedly in rat EAU before and after the onset.

[はじめに]

細胞表面上に発現する接着分子の動態は、リンパ球の活性化による炎症組織への浸潤や増殖の際に変動し、炎症病態の形成に重要な役割を持つことがわかっている

1)2)3)。リンパ球に広く発現する接着分子としてL-selectinとLFA-1が知られており、この両接着分子は、免疫細胞の炎症局所への遊走に関わる以外に、リンパ球の恒常的なホーミングに際しても働き、血管内腔から組織内への浸潤に必要とされる。動物における各種炎症モデルで、その発症にはこれら接着分子の存在が不可欠であるという多くの報告がある4)5)が、その実体については不明な点が多く残されている。今回我々は、ヒトの内因性ぶどう膜炎のモデルであるラットの実験的自己免疫性網膜ぶどう膜炎（EAU）発症過程における、リンパ球細胞表面の接着分子陽性率の変動について検討致した。

[材料及び方法]

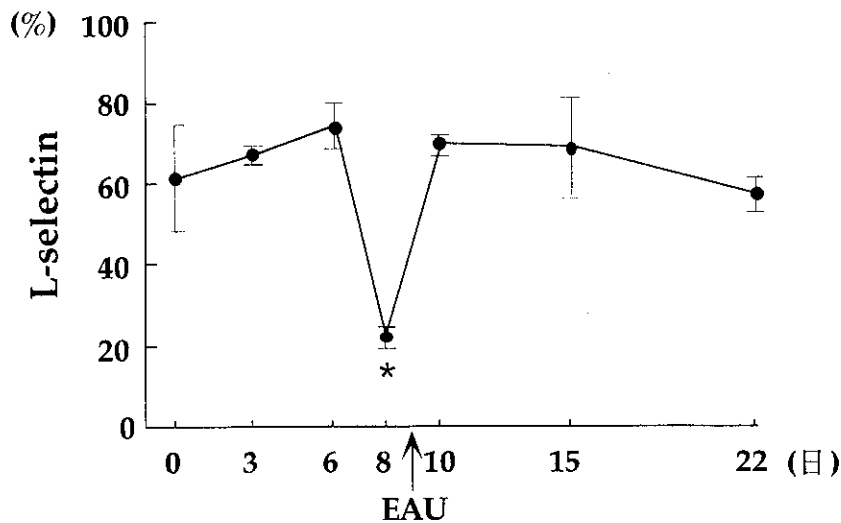
動物はルイスラット、6週齢雄24匹を使用致した。ラットの免疫には合成ペプチドR14を抗原として用いた。免疫をしていない0日群及び免疫後3、6、8、10、15、22日目の免疫群から脾臓を摘出し、比重遠心法によりリンパ球を分離した。そして、抗ラットCD4、L-selectin、LFA-1蛍光標識モノクローナル抗体を用いてリンパ球を染色し、フローサイトメータでその陽性率を解析致した。

[結果]

1. CD4陽性細胞におけるL-selectinの陽性率

非免疫群である0日群では陽性率は62%で、免疫後6日目には74.9%と軽度の上昇を示した。しかし、EAU発症直前の8日目には22.7%と有意に低下を示した。その後10日目には69.8%と再び上昇し、0日群と同程度の陽性率に戻った(図-1)。

図1. CD4 陽性細胞における L-selectin 陽性率

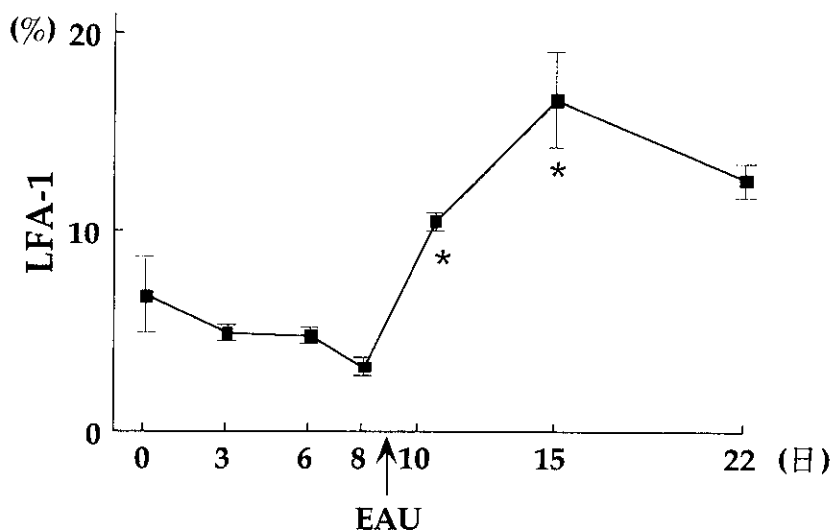


*0日群に比べ有意に低下した(p < 0.01)

2. CD4陽性細胞におけるLFA-1の陽性率

EAUの発症前の8日目までは陽性率は3-6%の低値を示していたが、発症期の10日目から上昇を始め、15日目をピークとして有意に上昇し22日目には軽度低下した(図-2)。

図2. CD4 陽性細胞における LFA-1陽性率



*0日群に比べ有意に上昇した($p < 0.01$)

[考案・結論]

今回、EAUではL-selectin、LFA-1ともに脾臓リンパ球における陽性率に変動がみられたが、L-selectin陽性率が発症直前に一過性に低下したのに比べ、LFA-1陽性率は発症後から変動を始め局所での炎症極期に一致する数日間にかけて上昇した。この両者の変化は、全身的な免疫反応と共に眼局所に生じた炎症に関わるリンパ球の活性化も反映していると考えられ、L-selectinがリンパ球の活性化初期の段階に関与すると推測されるのに比べ、LFA-1は炎症の継続に何らかの役割を果たしていると推測される。

L-selectinとLFA-1は、静止期および活性化リンパ球における発現動態がそれぞれ異なり、静止期リンパ球ではL-selectinが常時発現しているのに対し、LFA-1の発現量は少ない6)。しかし、サイトカイン刺激などによりリンパ球が活性化すると、L-selectinは細胞表面より脱落して容易にdown regulationを受ける一方、LFA-1は発現が増加し、接着機能が亢進することが知られている7) 8)。マクロファージ系サイトカインであるTNF- α やIL-1 β は、炎症細胞や血管内皮細胞表面の接着分子の発現量を制御していることが分かっており9)、また、EAUではその発症時期にTNF- α が上昇することが示されている10)。このことから、TNF- α は今回のEAUにおける接着分子の動態にも強い影響を与えている可能性がある。

各種炎症動物モデルの発症において、微小循環でのリンパ球-血管内皮細胞間の接着とそれに引き続く組織内への移行にL-selectin、LFA-1の存在が重要であることが分かり11)12)、この両接着分子をその抗体を用いて抑制することで、炎症モデルの治療が数多く試みられ、著明な抑制効果が得られている13)14)。

EAUにおいて発症時期に前後して脾臓CD4陽性リンパ球の両接着分子の発現が大きく変動することを明らかにした。今後さらにEAUにおける接着分子の解析を進め、ベーチェット病をはじめとする人のぶどう膜炎の治療に応用していく予定である。

[参考文献]

- 1) 田中良哉:Tリンパ球の接着機構. 臨床免疫 1993;25:1231-1239.
- 2) Springer TA : Adhesion receptors of the immune system. Nature 1990;346: 425-434.
- 3) Butcher E :Leukocyte-endothelial cell recognition: three(or more)steps to specificity

and diversity. *Cell* 1991;67: 1033-1036.

4) Gallatin WM, Weissman IL et al :A cell surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature* 1983;303:30-34.

5) Hamann A, Jablonski-Westrich D et al:Evidence for an accessory role of LFA-1 in lymphocyte-high endothelium interaction during homing. *J Immunol* 1988;140:693-699.

6) 田中良哉:T細胞. *臨床免疫* 1996;28:404-411.

7) Tedder TF, Penta AC et al:Expression of the human leukocyte adhesion molecule, LAM1. Identity with the TQ1 and Leu-8 differentiation antigens. *J Immunol* 1990; 144:532-540.

8) Akbar AN, Salmon M et al: The synergy between naive and memory T cells during activation. *Immunol Today* 1991;12:184-188.

9) Simizu Y, Newman W et al:Four molecular pathways of T cell adhesion to endothelial cells: roles of LFA-1, VCAM-1 and ELAM-1 and changes in pathway hierarchy under different activation conditions. *J Cell Biol* 1991;113:1203-1212.

10) Nakamura S, Yamakawa T et al: The role of tumor necrosis factor-alpha in the induction of experimental autoimmune uveoretinitis in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35: 3884-3889.

11) Gallatin WM, Weissman IL et al :A cell surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature* 1983;303:30-34.

12) Hamann A, Jablonski-Westrich D et al:Evidence for an accessory role of LFA-1 in lymphocyte-high endothelium interaction during homing. *J Immunol* 1988; 140:693-699.

13) Kawasaki K, Yaoita E et al: Antibodies against intercellular adhesion molecule-1 and lymphocyte function-associated antigen-1 prevent glomerular injury in rat experimental crescentic glomerulonephritis. *J Immunol* 1993;150:1074-1083.

14) Johnston B, Walter UM et al:Differential roles of selectins and the alpha4-integrin in acute, subacute, and chronic leukocyte recruitment in vivo. *J Immunol* 1997; 159:4514-4523.

HLA クラス I 領域の構造解析 およびベーチェット病原因候補遺伝子の探索

猪子 英俊 (東海大学医学部分子生命科学)
椎名 隆 (東海大学医学部分子生命科学)
田宮 元 (東海大学医学部分子生命科学)
岡 晃 (東海大学医学部分子生命科学)
佐野 和美 (東海大学医学部分子生命科学)
木村 孝博 (横浜市立大学医学部眼科)
矢吹 和朗 (横浜市立大学医学部眼科)
後藤 香織 (横浜市立大学医学部眼科)

KEYWORD = ベーチェット病, HLA, シークエンシング

〔目的〕 HLA クラス I 領域におけるシークエンシング解析の結果をもとに、ベーチェット病の原因候補遺伝子を同定する。〔方法〕 HLA クラス I 領域をカバーするコスミド、PAC/BAC クローンの塩基配列をショットガン法により決定した後、遺伝子の予測やデータベース解析、RT-PCR 解析などの各種遺伝子解析を行った。〔結果〕 IkBL から HLA-F 遺伝子までをカバーするコスミドクローン 24 個、BAC 3 個、PAC 8 個の計 1,797 kb の連続した塩基配列を決定した結果、この領域には、127 個の遺伝子と 758 個のマイクロサテライトが見い出された。これらの遺伝子の中、ベーチェット病の原因候補遺伝子が存在すると考えられる MICA~HLA-B 間 46 kb 内には、2 つの発現遺伝子 (MICA と HLA-B) と 1 つの EST (yv75a05) が同定された。〔結論〕 ベーチェット病の原因候補遺伝子は MICA~HLA-B 間の 46 kb 内に存在する MICA, HLA-B および yv75a05 に絞り込まれた。

Structural analysis of HLA class I region between the IkBL to HLA-F genes and identification of Behcet's disease candidate gene.

Hidetoshi Inoko (Tokai University School of Medicine, Department of Molecular Life Science II)
Takashi Shiina (Tokai University School of Medicine, Department of Molecular Life Science II)
Gen Tamiya (Tokai University School of Medicine, Department of Molecular Life Science II)
Akira Oka (Tokai University School of Medicine, Department of Molecular Life Science II)
Kazumi Sano (Tokai University School of Medicine, Department of Molecular Life Science II)
Kazuhiro Kimura (Yokohama City University, Department of Ophthalmol.)
Kazurou Yabuki (Yokohama City University, Department of Ophthalmol.)
Kaori Gotoh (Yokohama City University, Department of Ophthalmol.)

[purpose] We have currently conducted large scale genome sequencing of the 1.8 Mb

segment in the class I region from the centromeric boundary (the *MICB* gene) to the *HLA-F* gene in order to elucidate the gene organization of the HLA associated diseases such as Behcet's disease. [Method] Nucleotide sequence determination was carried out by the shotgun method. Homology and Grail search of the sequence data with the aid of computer analyses as well as RT-PCR, Northern hybridization and cDNA cloning was carried out to detect new expressed genes. [Results] We revealed the existence of 127 genes in total, namely 23 known expressed genes, 12 new expressed genes, 22 EST sites, 30 known pseudogenes, 37 new pseudogenes and 3 potential coding sequences in this region. A total of 758 microsatellite repeats have been found in this region. Among them, 38 microsatellites so far examined displayed a high degree of genetic polymorphism in the repeat number and were expected to serve as good genetic markers for focusing susceptible loci of Behcet's disease. Interestingly, two genes and one EST sequences were included in the 46 kb of Behcet's disease region between the *MICA* to *HLA-B* genes, where the causative gene for Behcet's disease is supposed to be localized. Therefore, the candidate genes for Behcet's disease were narrowed down to three expressed gene.

【はじめに】

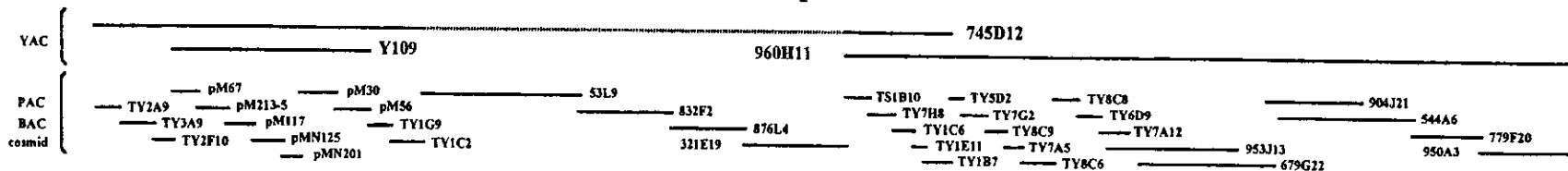
ヒト主要組織遺伝子複合体である HLA (Human Leukocyte Antigen) 遺伝子群は、自己-非自己の識別に関与し、免疫応答の誘導に深く関わる白血球抗原をコードする多重遺伝子族に属している。この領域は、クラス I 領域、クラス II 領域およびクラス III 領域から構成されているが、現在までところ 20 kb に一個の頻度で遺伝子が発見されているという、ヒト染色体のなかで最も高い遺伝子密度を有すること、また最も高度な遺伝的多型性をしめすこと、しかも様々な疾患に対する感受性を規定していることなど、様々な興味ある特徴を有している。我々は、この 4,000 kb 以上からなる HLA 遺伝子領域にマップされるベーチェット病の発症に関与する遺伝子の同定を目的の一つとして、HLA 全領域のクローニング、塩基配列の決定などによりその遺伝子構造の解明を進めている。これら 3 つの領域の内、クラス I 領域 (2,000 kb) については未だ解析が進んでいないことから、見い出されている遺伝子も他領域に比して、少ないのが現状である。さらに、我々はベーチェット病の原因候補遺伝子をこのクラス I 領域内の *HLA-B*, *HLA-C*, *HLA-E* 遺伝子近傍に、マッピングしている。

そこで、本研究では、まず、コスミドクローン並びに BAC や PAC クローンをを用いて *HLA-B*, *HLA-E* 遺伝子付近を含む *MICB* から *HLA-F* 遺伝子までの 1.8 Mb における整列化を行った。その後、これらクローンの塩基配列を決定し、クラス I 領域における各種遺伝子解析を行った。これらの結果をもとに、*HLA-B* 遺伝子付近にマップされる全身性炎症性

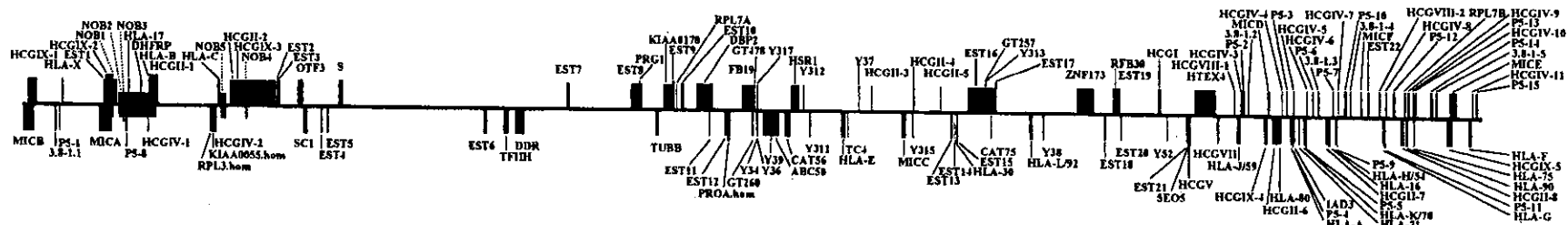
Class I

1,796,938bp

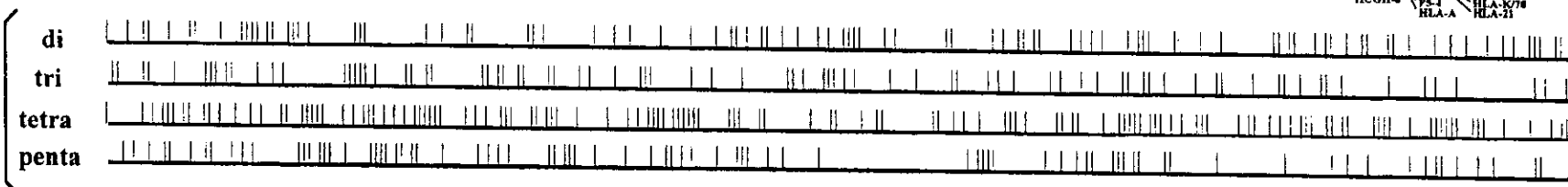
alignment
map



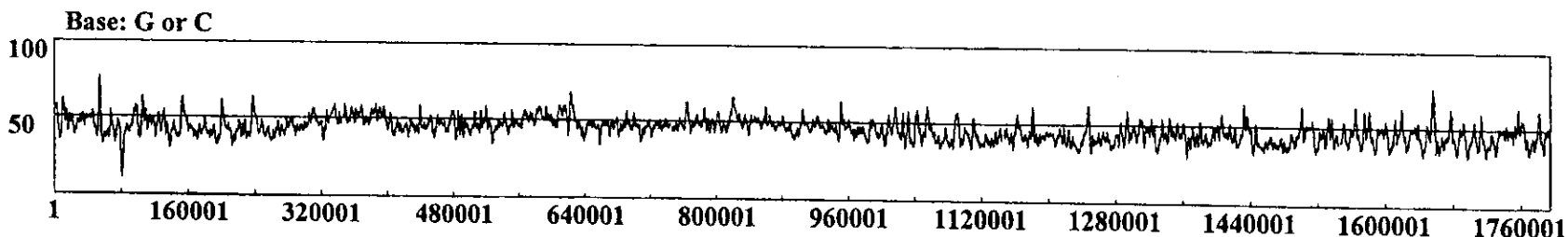
Gene map



Micro
satellite



GC%



Restriction
Enzyme
map

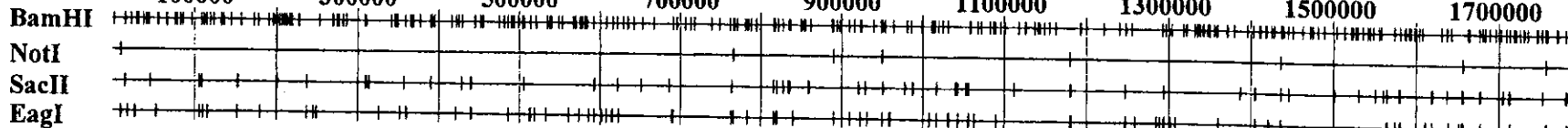


図1. HLAクラスI領域 1.8Mbの遺伝子解析

疾患であるベーチェット病の原因遺伝子を探索した。

【方法】

(1) 塩基配列の決定並びに遺伝子解析

24 個のコスミドクローン、3 個のBAC クローンおよび 8 個の PAC クローン について、キメラでないことを FISH 法で確認した後、塩基配列を決定した。塩基配列の決定には、ショットガン法により得られたランダムクローンについて、DNA シークエンサー 373S または 377 PRISM (ABI 社) を用いて行った。各塩基配列の解読重複度は平均 7.14 であり、その精度は 99.99n% 以上である。得られた塩基配列データより、既知の遺伝子やESTシーケンスとのホモロジー検索には、BLASTn、BLASTx、FASTAなどの各プログラムを用いた。また、コーディングやエキソン領域の予測には、Grail や Genscan などの各プログラムを用いた。マイクロサテライトの同定は Sputnik ソフトウェアを用いて行った。マイクロサテライトの遺伝的多型は健常日本人 100 名の DNA を用いた各 PCR 産物について DNA シークエンサー 377 PRISM (ABI 社) によるサイズ測定により行った。

(2) 発現遺伝子の同定

ホモロジーの検索やコーディング領域の予測により、遺伝子の存在が予想された領域について、塩基配列データに基づいて設計したプライマーを用いた RT-PCR、ノザンハイブリダイゼーション、cDNA ライブラリーのスクリーニングによる cDNA クローンの単離により、新発現遺伝子の同定を行った。

(3) ベーチェット病の原因遺伝子のマッピング

ベーチェット病患者 90 名の末梢血より精製した DNA を用いて、本領域に見い出された microsatellite の多型解析を各 PCR 産物について DNA シークエンサー 377 PRISM (ABI 社) によりサイズ測定により行った。

【結果】

(1) HLA クラス I 領域におけるゲノム解析

塩基配列を決定した結果、MICB 遺伝子から HLA-F 遺伝子までの HLA クラス I 領域は、1,796,938 bp (約 1.8 Mb) であった。既存の DNA データバンクとのホモロジー解析の結果、23 個の発現既知遺伝子、12 個の発現新規遺伝子、22 個の EST と一致する領域、67 個の偽遺伝子および、3 個の発現可能な塩基配列の計127 個の遺伝子あるいは遺伝子候補領域を見出した (図 1)。したがって、HLA クラス I 領域は 14.1 kb に一個という高い遺伝子密度を有することがわかった。この遺伝子密度はクラス II 領域 (25.0 kb に一個) より高く、クラス III 領域 (14.3 kb に一個) とほぼ同様な値を示した。また、

この遺伝子密度は3つの各領域における GC 含量と相対的にはほぼ比例していた。すなわち、本領域の平均 GC 含量は 45.8% (H1 バンドに相当) であり、これは、L バンドに相当するクラス II 領域 (40%) よりも高く、H3 バンドに相当するクラス III 領域 (53%) よりも低い割合であった。

HLA クラス I 領域テロメア側 300 kb (HLA-J~HLA-F 間) について、Dot matrix 解析を行った結果、MICD, MICE およびMICF 遺伝子上流側 30~50 kb において、セントロメア側に位置するMICA, MICB と同様にそれぞれ大規模な遺伝子重複が認められた。特に、MICAの上流側の HCGIX-2, P5-8 遺伝子に対して、MICB の上流側には、HCGIX-1, 3.8-1.1, P5-1 遺伝子が、MICD の上流側には、HCGIX-4, 3.8-1.2, P5-12 遺伝子が、MICE の上流側には、HCGIX-5, 3.8-1.5, P5-14 遺伝子が、MICF の上流側には、3.8-1.4, P5-10 遺伝子がそれぞれ同様の位置に認められた。また、この HLA-J~HLA-F 間の 300 kb については、クラス I 遺伝子をはじめ、P5, MIC, HCGII, HCGIV 遺伝子などの重複を起こした遺伝子が多く存在することから、各遺伝子における系統樹を作成し、Dot matrix 解析と併せてこの領域の進化を推定した結果、8~20 kb の領域が 7 回の遺伝子重複を起こして形成されたものと考えられた。また、セントロメア側のベーチェット病の感受性原因遺伝子領域を含む MICB~HLA-C 領域間にも P5, MIC, HCGII, HCGIV 遺伝子が認められることから、現段階では、MICE 領域から MICA 領域へ duplication (倍化) した後、転座したものと考えられた。

また、このクラス I 領域におけるマイクロサテライトの分布を塩基配列より検索した結果、5 回以上の反復を有する 135 個の 2 回繰り返し配列、4 回以上の反復を有する 107 個の 3 回繰り返し配列、3 回以上の反復を有する 199 個の 4 回繰り返し配列、2 回以上の反復を有する 114 個の 5 回繰り返し配列、合計 758 個のマイクロサテライト配列を見出した。これらのマイクロサテライトのうち、70 個について多型性を検索した結果、38 個が平均対立遺伝子 (アリル: allele) 数 8.9、ヘテロ接合体頻度 66% で、遺伝マーカーとして十分な多型性を有していた。これらのマイクロサテライトは繰り返し配列の回数に高度な多型を示し、遺伝病の感受性遺伝子の詳細なマッピングに有用な遺伝多型マーカーと考えられることから、以下に示すベーチェット病の感受性原因遺伝子のマッピングに供した。

(2) ベーチェット病原因候補遺伝子の探索

我々のこれまでの解析により、ベーチェット病の発症を規定している原因遺伝子が、HLA-B 遺伝子よりセントロメア側約 200 kb 以内に存在することを明らかにしている。そこで、より精度高くマップするにはより多くの遺伝マーカーを必要とする。そこで、microsatellite 繰り返し多型をしめす dinucleotide リピート (5 回繰り返し以上) の本領域内での存在を塩基配列の解析より、検索した。その結果、HLA-B, HLA-C 遺伝子を含む領域 (IkBL~S 遺伝子間: 452 kb) には 35 個、平均 12.9 kb に一個という、高密度かつ均等

に dinucleotide リピートが見い出された。これらの dinucleotide リピートを用いた多型解析の結果、ベーチェット病の感受性原因遺伝子は MICA と HLA-B 遺伝子間の 46 kb 内に存在する可能性が高いことが示唆された。そこで、この領域におけるホモロジー解析、遺伝子検索解析、RT-PCR 解析およびノザンハイブリダイゼーション解析を行った結果、2 つの発現遺伝子 (MICA と HLA-B) と 1 つの EST (yv75a05) が見い出された。したがって、この 3 つの遺伝子はベーチェット病の原因候補遺伝子である可能性がより強く示唆された。

【考察および結論】

HLA クラス I 領域 (MICB ~ HLA-F 遺伝子間) について連続した 1,797 kb の塩基配列を決定した。この領域の遺伝子密度は 14.1 kb に 1 つの割合であり、これは、クラス III 領域 (one gene / 14.3 kb) とほぼ同等の割合であり、クラス II 領域 (one gene / 25.0 kb) より高い割合であった。また、MICB から HLA-C 間および HLA-J から HLA-F 間に、8~20 kb という大規模な遺伝子重複が認められた。クラス II 領域ではこのような遺伝子重複が認められないことから、クラス I 領域の形成の原動力に遺伝子倍化が大きく貢献し、しかもその原形をとどめていること、すなわち、クラス I 領域はクラス II 領域に比べて、進化的に新しく形成されたことをしめしているのかもしれない。また、ベーチェット病の感受性原因遺伝子領域を含む MICB~HLA-C 領域間は HLA クラス I 領域の形成の初期から独自の進化を辿っており、この事実がベーチェット病の起源に迫ることができるかもしれない。

また、MICB から HLA-C 付近の microsatellite 解析よりベーチェット病の原因遺伝子は MICA から HLA-B 間の 46 kb の範囲に絞り込まれた。この領域内には、2 つの発現遺伝子 (MICA と HLA-B) および 1 つの EST が同定されたことから、これらの遺伝子や EST とがベーチェット病の原因遺伝子である可能性が高い。現在、患者におけるこれら遺伝子のシーケンシング解析を行い、塩基上における特徴付けを行っている。

【論文発表】

- 1 Okamoto N, Kennedy, SD, Barron-Casel EA, Casella JF, Inoko H, Kickler TS : Identification of a human heavy chain antibody fragment directed against human platelet alloantigen 1a (HPA-1a) by phage display library. *Tissue Antigens* 51 : 156-163, 1998.
- 2 Kobayashi T, Yokoyama I, Hayashi S, Negita M, Namil Y, Katayama A, Nagasaka T, Koike C, Tachi Y, Mei GL, Haba T, Tominaga Y, Naruse T, Inoko H, Uchida K, Yakagi H : TAP1, TAP2, LMP2, DMA and DMB genetic polymorphisms in renal

transplantation. *Transplant. Proceedings* 30 : 29-30, 1998.

- 3 Shiina T, Tamiya G, Oka A, Yamagata T, Yamagata N, Kikkawa E, Got K, Mizuki N, Watanabe K, Fukuzumi Y, Taguchi S, Sugawara C, Ono A, Chen L, Yamazaki M, Tashiro H, Ando A, Ikemura T, Kimura M, Inoko H : Nucleotide sequencing analysis of the 146 kb segment around the *IkBL* and *MICA* genes at the centromeric end of the HLA class I region. *Genomics* 47 : 372-382, 1998
- 4 Mizuki N, Ohno S, Ando H, Chen L, Sato T, Imanishi T, Gojobori T, Ishihara M, Mizuki N, Geng Z, Geng L, Li G, Inoko H : Major histocompatibility complex class II alleles in an Uygur population in Northwest China. *Tissue Antigens* 51 : 287-292, 1998
- 5 Naruse TK, Nose Y, Ando R, Araki N, Shigenari A, Ando A, Ishihara M, Kagiya M, Isshiki G, Inoko H : Extended HLA haplotypes in Japanese homozygous typing cells. *Tissue Antigens* 51 : 305-308, 1998
- 6 Goto K, Ota M, Ando H, Mizuki N, Nakamura S, Inoue K, Yabuki K, Kotake S, Katsuyama Y, Kimura M, Inoko H, Ohno S : *MICA* gene polymorphism and HLA-B27 subtypes in Japanese patients with HLA-B27 associated acute anterior uveitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39 : 634-637, 1998.
- 7 Tamiya G, Ota M, Katsuyama Y, Shiina T, Oka A, Makino S, Kimura M, Inoko H : Twenty-six new polymorphic microsatellites markers around the HLA-B, -C and -E loci in the human MHC class I region. *Tissue Antigens* 51 : 337-346, 1998.
- 8 Katsuyama Y, Inoko H, Imanishi T, Mizuki N, Gojobori T, Ota M : Genetic relationships among Japanese, Northern Han, Hui, Uygur, Kazakh, Greek, Saudi Arabian and Italian populations based on allelic frequencies at four VNTR (*D1S80*, *D4S43*, *COL2A1*,

- D17S5) and one STR (ACTBP2) Loci. *Human Heredity* 48 : 126-137, 1998.
- 9 Taniguchi Y, Matsuzaka Y, Fujimoto H, Miyado K, Kohda A, Okumura K, Kimura M and Inoko H : Nucleotide sequence of the Ring3 gene in the class II region of the mouse MHC and its abundant expression in testicular germ cells. *Genomics* 51 : 114-123, 1998.
- 10 Kimura T, Goto K, Yabuki K, Mizuki N, Tamiya G, Sato M, Kimura M, Inoko H, Ohno S : Microsatellite polymorphism within the MICB gene among Japanese patients with Behcet's disease. *Hum Immunol* 59 : 500-502, 1998.
- 11 Ito Y, Ando A, Ando H, Ando J, Saijoh Y, Inoko H, Fujimoto H : Genomic structure of the spermatid-specific Hsp70 homolog gene located in the class III region of the major histocompatibility complex of mouse and man. *J Biochem* 124 : 347-353, 1998.
- 12 Kameda H, Pandey JP, Kaburaki J, Inoko H, Kuwana M : Immunoglobulin allotype gene polymorphism in systemic sclerosis : Interactive effect of MHC class II and Km genes on anticentromere antibody production. *Annals of Rheumatic Disease* 57 : 366-370, 1998.
- 13 Takegoshi M, Maeda F, Tachibana H, Inoko H, Kato S, Takakura I, Kenjyo T, Hiraga S, Ogawa Y, Horiki T, Ihara S : Human monoclonal anti-HCMV neutralizing antibody from phage display libraries. *J. Virol. Method* 74 : 89-98, 1998.
- 14 Goto K, Ota M, Maksymowych WP, Mizuki N, Yabuki K, Katsuyama Y, Kimura M, Inoko H, Ohno S : Association between MICA gene A4 allele and acute anterior uveitis in white patients with and without HLA-B27. *Am J Ophthalmol* 126 : 436-441, 1998.

- 15 Sazazuki T, Juji T, Morishima Y, Kinukawa N, Kashiwabara H, Inoko H, Yoshida T, Kimura A, Akaza T, Kamikawaji N, Kodera Y, Takaku F : Importance of HLA-class I allele matching for clinical outcome after unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *N Engl J Med.* 339 :1177-1185, 1998.
- 16 Shiina T, Kikkawa E, Yamagata T, Saito W, Tamiya G, Oka A, Watanabe K, Yamazaki M, Tashiro H, Okumura K, Ando A, Kimura M, Soeda E, Pontarotti P, Inoko H : Physical mapping of 620 kb between the S and HLA-E genes in the midst of the human MHC class I region by construction of a BAC, PAC and cosmid contig. *Immunogenetics* 48 : 402-407, 1998.
- 17 Kawakami S, Mitsunaga K, Kikuti YY, Ando A, Inoko H, Yamamura K, Abe K : Tctex3, related to drosophila polycomblike, is expressed in male germ cells and mapped to the mouse t-complex. *Mamm Genome* 9 : 874-880 , 1998.
- 18 Shigenari A, Ando A, Baba T, Yamamoto T, Katsuoka Y, Inoko H : Characterization of alkaline phosphatase genes expressed in seminoma by cDNA cloning. *Cancer Research* 58 : 5079-5082, 1998.
- 19 Yabuki K, Ota M, Goto K, Kimura M, Nomura E, Ohno S, Mizuki N, Katsuyama Y, Makysymowych WP, Bahram S, Kimura M, Inoko H : Triplet repeat polymorphism in the MICA gene in HLA-B27 positive and negative Caucasian patients with ankylosing spondylitis. *Hum. Immunol.* 60 : 83- 86, 1999.
- 20 Chen L, Sato M, Inoko H, Kimura M: Molecular cloning of a leucine zipper motif-containing novel cDNA specifically expressed in adult mouse testis. *DNA Sequence* in press
- 21 Ando A, Kikuti YY, Shigenari A, Kawata H, Ikemura T, Inoko H : cDNA cloning, Northern hybridization and mapping of a putative GDS (guanine nucleotide dissociation stimulator of G proteins)-

- related protein gene at the centromeric ends of the human and mouse MHC regions. Immunogenetics in press.
- 22 Yamazaki M, Tateno Y, Inoko H : Genome organization around the centromeric end of the HLA class I region ; large-scale sequencing analysis. J. Mol. Evol. in press
- 23 Shiina T, Inoko H : Molecular analysis of MHC class I cDNA in quail : multiple class I loci are expressed in the quail MHC. Immunogenetics in press
- 24 Shiina T, Inoko H : Gene organization of the quail major histocompatibility complex (MhcCoja) class I gene region : Remarkable dissimilarity to the chicken Mhc and the existence of the transporter associated with antigen processing (TAP) gene. Immunogenetics in press
- 25 Wallace GR, Verity DH, Delamaine LJ, Ohno S, Inoko H, Ota O, Mizuki N, Yabuki K, Stephens HA, Kondiatis E, Madanat W, Kanawati CA, Stanford MR, Vaughan RW : Association of MICA alleles with Behcet's disease. Immunogenetics in press
- 26 Komatsu-Wakui M, Tokunaga K, Ishikawa Y, Kashiwase K, Moriyama S, Tsuchiya N, Ando H, Shiina T, Geraghty DE, Inoko H, Juji T : Polymorphism of MICA in Japanese and a MICA-MICB null haplotype. Immunogenetics in press
- 27 Moribe T, Kaneshige T, Inoko H : Rapid HLA class I DNA typing using microtiter plate-reverse hybridization assay (MRHA) by simple thermoregulation : High resolution subtyping of HLA-A2 and -B40 alleles. Tissue Antigens in press
- 28 Naruse KN, Kawata H, Anzai T, Takashige N, Kagiya M, Nose Y, Nabeya N, Isshiki G, Tatsumi N, Inoko H : Limited polymorphism in the HLA-DOA gene. Tissue Antigens in press

Ozawa A, Iwashita K, Miyahara M, Sugai J, Iizuka M, Kawakubo Y, Ohkido M, Naruse T, Anzai T, Takashige N, Ando A, Inoko H :
Immune response against varicella-zoster virus (VZV) -HLA
analysis in postherpetic neuralgia (PHN)-. Tissue Antigens in press

EAU 誘導ペプチド封入リポソーム前投与による、 マウス EAU 発症抑制

小野江和則 (北海道大学免疫科学研究所,病理部門)
北市 伸義 (北海道大学医学部,眼科)
南場 研一 (北海道大学医学部,眼科)
小竹 聡 (北海道大学医学部,眼科)
笹本 洋一 (北海道大学医学部,眼科)
小笠原一誠 (北海道大学免疫科学研究所,病理部門)

KEYWORD=実験的自己免疫性網膜ぶどう膜炎(EAU)、リポソーム、
抗原前投与、EAU 抑制

[目的] 我々は B10.BR マウスに実験的自己免疫性ぶどう膜炎(EAU)を誘導するペプチド K2 を同定し、報告してきた。今回、K2 を封入したリポソームをマウスに前投与することにより、EAU を抑制することができるか検討した。 [材料と方法] 1) K2 を封入したリポソームを B10.BR の皮下に投与した。10 日後 K2, CFA で免疫し、さらに 10 日後に抗原ペプチドに対する T 細胞増殖反応を測定した。2) 同様に K2 封入リポソームを前投与し、10 日後 K2, CFA で免疫し、さらに 不活化百日咳死菌を腹腔内投与して EAU を誘導した。3) OVA323-339 に特異的な TCR 遺伝子を導入した DO11.10 マウスより得たリンパ球を BALB/c マウスに移入し、リポソーム封入 OVA323-339 で前処置後、OVA323-339 で免疫し、TCR クロノタイプ抗体(KJ1.26)陽性 T 細胞数とその反応性を解析した。 [結果と考察] 1) K2 単独投与と比較し、K2 をリポソーム封入投与することにより、T 細胞反応はより強く抑制された。2) この前処置を行うことにより、EAU 発症は抑制された。さらに、前投与時に抗 CD40L 抗体を同時に投与することにより、EAU 抑制効果は増強した。3) DO11.10 リンパ球移入マウスでは、リポソーム封入ペプチド投与による KJ1.26 陽性細胞数に大きな変化はなかったが、OVA323-339 に対する反応性が低下しており、アナジーが誘導されていると考えられた。これらの結果より、リポソーム封入抗原の前投与により、自己免疫疾患の発症が抑制される可能性が示唆された。

Inhibition of experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) by pre-treatment with liposomal antigen

Kazunori Onoé (Section of Pathology, Institute of Immunological Science Hokkaido University), Nobuyoshi Kitaichi, Kenichi Namba, Satoshi Kotake, Yoichi Sasamoto (Department of Ophthalmology, Hokkaido University School of Medicine), Kazumasa Ogasawara (Section of Pathology, Institute of Immunological Science Hokkaido University)

[Purpose] We have reported that the interphotoreceptor retinoid binding protein (IRBP) derived peptide, K2, induces experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) in B10.BR (H-2A^k) mice. Herein, we attempted to inhibit EAU in B10.BR mice by s.c. administration of liposomal K2 before immunization with K2. [Methods] K2 (50nmol) in liposome was administrated subcutaneously to B10.BR mice (6-8 weeks old). 1) After 10 days, the mice were immunized with K2 (20nmol) in CFA. T cells from the draining lymph nodes were cultured with irradiated syngeneic spleen cells and K2 for 3 days. Evaluation of T cell proliferative responses was performed by ³H-thymidine incorporation. 2) Ten days after the pre-treatment with liposomal K2, or liposomal K2 plus anti-CD40 ligand (L) mAb, B10.BR mice were immunized with K2 emulsified in CFA. Thereafter an additional adjuvant, *Bordetella pertussis* toxin, was injected intraperitoneally. These mice were examined for disease onset by inspecting the fundus every second day. The severity of EAU was graded on a scale of 0 (no disease) to 4 (severe disease) according to the clinical criteria. [Results] Pre-treatment of mice with liposomal K2 inhibited ³H-thymidine incorporation of the K2 primed T cells, which might be attributable to anergy induction. In addition, the development of EAU was delayed in the mice pre-treated with liposomal K2. The inhibition was seen more considerably in mice pre-treated with liposomal K2 plus anti-CD40L mAb.

[はじめに]

我々は、MHC class II である H-2A^k を有する B10.BR マウスに実験的自己免疫性網膜ぶどう膜炎 (以下、EAU) を誘導する視細胞間結合レチノイド蛋白 (IRBP) 由来ペプチド K2 を同定し、これまで報告してきた 1)。今回は、K2 を封入したリポソームを免疫前投与することによりペプチド特異的アナジーを誘導し、EAU の抑制を試みた。

[材料と方法]

1) PBS 単独、K2 を PBS に溶解したもの、K2 封入りリポソーム、および K2 封入りリポソームと抗 CD40 リガンド抗体をそれぞれ B10.BR マウスに皮下