

図5 Induction of IL-6 with FSH in PBMC

以上のことから、女性ベーチェット患者では一般的に生理直前に口内炎等の増悪が認められるが、性ホルモンによって直接又は間接的にIL-6が産生され症状増悪が生じる可能性が示唆された。但し、本研究は十分な実験結果から導きだされたものではないので、あくまで予備実験によることを付け加え、今後確認を要すと思われる。

[考察]

- 1) ベーチェット病患者に対するセントコア社の開発したキメラ型抗TNF- α 抗体 (cA2) による治療研究は、現在臨床導入における対象患者のクライテリア決定、検査項目、研究施設の選定等の問題点を解決している過程である。従って本年度内には患者への投与はできなかった。
- 2) ヒト抗サイトカイン抗体として抗IL-8抗体は作成した。今後ヒト抗TNF- α 抗体あるいはヒト抗IL-6レセプター抗体を作成し、ベーチェット病治療への適用を考えている。
- 3) マウス抗IL-8抗体はウサギ関節炎に対して関節内好中球浸潤を抑制したばかりでなく、関節軟骨破壊も抑制したことから、炎症初期ばかりでなく慢性化した時期にも有効であることが示唆された。ベーチェット病の一つの特徴は組織への好中球浸潤並びに好中球活性化が認められることから、IL-8活性阻害によるベーチェット病治療の可能性も示唆された。
- 4) 予備実験とはいうものの、今回の結果は、従来原因不明であった女性におけるベーチェット病の生理直前における症状増悪を、性周期に伴うペプチドホルモンの産生とIL-6との関連で説明できるのではないかという点で意義がある。今後は今回検索した患者ばかりでなく、一般の女性ベーチェット病患者についても検索し、普遍性の有無を検討したい。

[参考文献]

- 1) W. P. Arend, et al. Arth. Rheum. 38: 151-160, 1995
- 2) R. N. Maini, et al. Immunol. Rev. 144: 195-223, 1995
- 3) M. Feldmann, et al. Annu. Rev. Immunol. 14: 397-440, 1996

- 4) M. J. Elliott, et al. *Arth. Rheum.* 36: 1681-1690, 1993
- 5) M. J. Elliott, et al. *Lancet.* 344: 1105-1110, 1994
- 6) L. L. Green et al. *Nature Genetics.* 7: 13-20, 1994
- 7) 西 義介、日経サイエンス、25 : 40-50, 1995
- 8) I. Ishida, et al. *Microbiol. Immunol.* 42: 143-150, 1998
- 9) M. J. Mendez, et al. *Nature genetics.* 15: 146-156, 1997
- 10) C. A. Verburgh, et al. *Clinic. Rheum.* 12: 434-499, 1993
- 11) T. Akahoshi, et al. *Lymphokine Cytokine Res.* 13: 113-116, 1994

日本人、ギリシャ人、イタリア人におけるベーチェット病患者 のマイクロサテライト多型解析

太田 正穂 (信州大学医学部法医学教室)
勝山 善彦 (信州大学病院薬剤部)
水木 信久 (横浜市立大学医学部眼科学教室)
安藤 等 (東海大学医学部分子生命科学)
猪子 英俊 (東海大学医学部分子生命科学)

KEYWORD=ベーチェット病,マイクロサテライト多型,日本人,
ギリシャ人,イタリア人

〔目的〕 日本人、ギリシャ人、イタリア人におけるベーチェット病患者の HLA-B ローカス周辺に存在するマイクロサテライト解析を行い、本疾患の原因遺伝子をマッピングする。〔方法〕 本疾患群 172 人（日本人：95 人、ギリシャ人：55 人、イタリア人：22 人）と健康対照群 212 人（日本人：132 人、ギリシャ人：52 人、イタリア人：28 人）を対象に、MICA～HLA-C 遺伝子近傍に存在した 8 種類のマイクロサテライトを用いて多型解析を行った。〔結果〕 HLA-B ローカス近傍に存在する 8 種類（C1-2-A, MICA(GCT)_n, MIB, C1-4-1, C1-2-5, C1-3-1, C2-4-4, C3-2-11)のマイクロサテライトを用いて各民族でのベーチェット病との相関を調べたところ、MICA 遺伝子の TM(transmembrane)領域の A6 アリル、MIB 遺伝子の 348 アリルと C1-4-1 遺伝子の 217 アリルが各民族の疾患群で共通に有意に増加していた。また、各民族の疾患群で最も HLA-B51 抗原と最も強い相関を示した。これらのマイクロサテライトと HLA-B51 抗原とで層別解析を Mantel-Haenszel 法を用いて行ったところ、HLA-B51 抗原が疾患の罹患に第一義的な影響をおよぼすと考えられた。〔総括〕 ベーチェット病発症には、HLA-B51 抗原が疾患の罹患に第一義的に何らかの影響を及ぼすと考えられた。

Localization of the pathogenic gene of Behçet's disease onto the HLA-B locus by investigation of microsatellite polymorphism in three different populations.

Masao Ota (Shinshu University School of Medicine, Department of Legal

Medicine), Yoshihiko Katsuyama (Shinshu University Hospital, Department of Pharmacy), Nobuhisa Mizuki (Yokohama City University School of Medicine, Department of Ophthalmology), Hitoshi Ando (Tokai University School of Medicine, Department of Genetic Information, Division of Molecular Life Science), Hidetoshi Inoko (Tokai University School of Medicine, Department of Genetic Information, Division of Molecular Life Science)

[Purpose] In order to localize the critical region of the Behçet Disease (BD) pathogenic gene, we have investigated microsatellite markers distributed around the HLA-B gene among BD patients of three different ethnic origins, Japanese, Greek and Italian. [Method] A total of 172 BD patients consisting of 95 Japanese, 55 Greek and 22 Italian patients with BD were enrolled in this study. Serological HLA-B typing was performed by standard microlymphocytotoxicity technique. Eight microsatellite markers distributed within a 1,100 kb region surrounding the HLA-B gene were analyzed using PCR and subsequent automated fragment detection by fluorescent-based technology. [Result] Among the eight microsatellite markers, allele 348 of the MIB microsatellite 22 kb centromeric of HLA-B microsatellite was remarkably common in all the BD patient ethnic groups (Japanese: $P_c=0.000014$, Greek: $P_c=0.00047$, Italian: $P_c=0.11$). However, HLA-B51 was found to be the most strongly associated marker in each population (Japanese: $P_c=0.000000000017$, Greek: $P_c=0.00000032$, Italian: $P_c=0.011$). Further in the genotypic differentiation test between the patient and control groups, MICA, MIB, HLA-B and C1-2-5 reached the statistical significance ($P<0.00007$) in the Japanese patients, whereas only HLA-B did in Greek and Italian. Stratificational analysis for these genetic markers suggested that significant association of MICA and other microsatellites result from linkage disequilibrium with HLA-B51. [Conclusion] The pathogenic gene of BD is HLA-B51 itself, but unlikely to be other genes located in the vicinity of HLA-B.

[はじめに]

これまで我々は、日本人のベーチェット病患者群を対象として、HLA クラス I 遺伝子領域に存在する多数のマイクロサテライトを用いて多型解析を行い、本病の原因遺伝子の遺伝子を詳細にマッピングしてきた。その結果、本病の原因遺伝子は MICA ~ HLA-C 遺伝子間約 160 kb の領域に存在していることが示唆された。さらに、この領域内の 46 kb (MICA ~ HLA-B) に原因遺伝子があることがマイクロサテライト解析で確認された¹⁾。このことからわれわれは、日本人とは本領域内にあるマイクロサテライト間の連鎖が異なるギリシャ人とイタリア人について、同様の解析を行い、本病の原因遺伝子の正確な位置のマッピングを試みた。

[対象と方法]

マイクロサテライト多型解析に用いた日本人のベーチェット病患者の DNA は、横浜市立大学医学部眼科学教室より供与されたものを用いた (95 人)。健常人 DNA は日本人で血縁関係がない 132 人から得たものを用いた。また、ギリシャ人の DNA サンプルは Dr. Palimeris (University of Athens Medical School) から供与されたものを (患者 55 人、健常人 52 人)、イタリア人の DNA サンプルは Dr. Pivetti-Pezzi (University "La Sapienza") から供与されたもの (患者 22 人、健常人 28 人) を用いた。

HLA-B, HLA-C 遺伝子領域を含む YAC, BAC, PAC クローンより連結クローンを分離し、蛍光自動シーケンサーを用いたショットガン法にてその全塩基配列を決定した。この塩基配列をもとに、ホモロジーサーチを行い、既知遺伝子の同定、EST (expression sequence tag) 断片の検索および 2~5 塩基の反復配列からなるマイクロサテライトを検索を行った。そのうち HLA-B 周辺に存在する 8 種類のマイクロサテライトを用いて、健常人対照群と患者対照群の多型解析を蛍光自動シーケンサーと Genescan 672 Software (ABI) によるサザン法で行った。

統計学的有意差検定はカイ 2 乗値および Fisher の直接法による P 値検定にて行った。各マイクロサテライトと HLA-B 遺伝子間の連鎖解析は解析は Mantel-Haenszel の weighted odds 値にて行った。また、患者群、対照群の遺伝的偏りは、Markov chain parameter (GENEPOP software) による genotypic differentiation test²⁾ により解析した。

[結果と考察]

ゲノムのショットガンシーケンシングにより、第 6 染色体短腕のセントロメア側 MICB 遺伝子から HLA-F 遺伝子間の約 1800 kb の塩基配列を決定した³⁻⁵⁾。ホモロジー解析により、この領域に 16 個の偽遺伝子が同定され、23 個の新遺伝子および遺伝子の可能性のある領域が認められた。これらの塩基配列のデータをもとに、コンピューター解析によりマイクロサテライトを検索したところ、この領域に 2~5 塩基の反復配列からなる 758 個のマイクロサテライトを見いだした。これらのマイクロサテライトのうち 70 個を選び遺伝的多型性を調べたところ、26 個はマイクロサテライトとして有効な遺伝的情報を示すことが認められた。すなわち、これらのマイクロサテライトは平均 9.6 個のアリルを持ち、PIC (polymorphism content value) は 0.69 を示し、またいずれも Hardy-Weinberg の平衡を満たしていた。

そこで、ベーチェット病の原因遺伝子が座位していると考えられる MICB~HLA-C 遺伝子近傍の 8 種類のマイクロサテライト (C1-2-A, MICA (GCT)_n, MIB, C1-4-1, C1-2-5, C1-3-1, C2-4-4, C3-2-11) を用いて、日本人、ギリシャ人、イタ

リア人の患者群および健常人群を対象に多型解析を行った。その結果、HLA-B 遺伝子から46 kbセントロメア側に位置するMICA遺伝子TM(transmembrane) 領域の A6 マイクロサテライト(MICA*A6) 、HLA-B 遺伝子から 24 kb セントロメア側に位置する MIB マイクロサテライトのアリル 348(MIB*348)、HLA-B 遺伝子から 6 kb セントロメア側に位置する C1-4-1 マイクロサテライトのアリル 217(C1-4-1*217) が各民族の患者群で有意に増加していた (Tables 1~3)。

Table 1. Statistically significant alleles associated with Behçet disease in a Japanese population

| Marker | No of alleles | Cont(%) | | R.R. | χ^2 | p | Pc | |
|---------|---------------|-----------|-----------|----------|----------|-------|-----------|----------|
| | | N=132 | N=95 | | | | | |
| C1-2-A | 13 | 240 | 17(12.9) | 27(28.4) | 2.69 | 8.54 | 0.0035 | 0.045 |
| MICA | 5 | A6 | 62(47) | 67(70.5) | 2.70 | 12.50 | 0.00041 | 0.0020 |
| (TM) | | A5.1 | 36(27.3) | 7(7.4) | 0.21 | 14.25 | 0.00016 | 0.00080 |
| | | A5 | 71(53.8) | 40(42.1) | 0.62 | 3.02 | 0.082 | 0.41 |
| MIB | 12 | 348 | 16(12.1) | 38(40.0) | 4.83 | 23.68 | 1.1E-06 | 0.000014 |
| | | 344 | 10(7.6) | 27(28.4) | 4.84 | 17.60 | 0.000027 | 0.00033 |
| | | 336 | 40(30.3) | 9(9.5) | 0.24 | 14.16 | 0.00017 | 0.0020 |
| C1-4-1 | 6 | 217 | 87(65.9) | 82(86.3) | 3.26 | 12.09 | 0.00051 | 0.0030 |
| | | 225 | 35(25.9) | 11(11.6) | 0.36 | 7.63 | 0.0057 | 0.034 |
| | | 221 | 48(36.4) | 22(23.2) | 0.53 | 4.52 | 0.033 | 0.20 |
| HLA-B | 25 | B51 | 18(13.6) | 56(58.9) | 9.09 | 51.62 | 6.74E-13 | 1.69E-11 |
| C1-2-5 | 20 | 202 | 21(15.9) | 38(40.0) | 3.52 | 16.67 | 0.000045 | 0.00089 |
| | | 178 | 1(0.8) | 15(15.8) | 24.56 | 19.05 | 0.000011* | 0.00022 |
| C1-3-1 | 6 | 291 | 62(47) | 57(60.0) | 1.69 | 3.76 | 0.052 | 0.31 |
| | | 293 | 31(23.5) | 7(7.4) | 0.26 | 10.30 | 0.0013 | 0.008 |
| | | 288 | 106(80.3) | 66(69.5) | 0.56 | 3.53 | 0.060 | 0.36 |
| C2-4-4 | 13 | 255 | 22(16.7) | 35(36.8) | 2.92 | 11.96 | 0.00054 | 0.0071 |
| | | 231 | 107(81.1) | 60(63.2) | 0.40 | 9.11 | 0.0025 | 0.033 |
| C3-2-11 | 17 | 213 | 27(20.5) | 33(34.7) | 2.07 | 5.80 | 0.016 | 0.27 |

*:Fisher's exact test

**Table 2 Statistically significant alleles associated with Behçet disease
in a Greek population**

| Marker | No of alleles | allele | Cont(%) | Pat(%) | R.R. | χ^2 | p | P c |
|----------|---------------|--------|-----------|----------|-------|----------|----------|--------|
| | | | N=52 | N=55 | | | | |
| C1-2-A | 12 | 250 | 6(11.5) | 18(32.7) | 3.73 | 6.90 | 0.0086 | 0.108 |
| | | 258 | 13(25.0) | 5(9.1) | 0.30 | 4.83 | 0.025* | 0.30 |
| MICA(TM) | 5 | A6 | 30(57.7) | 44(80.0) | 2.93 | 6.24 | 0.013 | 0.065 |
| MIB | 15 | 348 | 15(28.8) | 38(69.1) | 5.51 | 17.32 | 0.000032 | 0.0005 |
| C1-4-1 | 6 | 217 | 33(63.5) | 50(90.9) | 5.76 | 11.57 | 0.00067 | 0.0005 |
| | | 221 | 22(42.3) | 11(20.0) | 0.34 | 6.24 | 0.013 | 0.088 |
| | | 229 | 12(23.1) | 5(9.1) | 0.33 | 3.91 | 0.043* | 0.26 |
| HLA-B | 27 | B51 | 12(23.1) | 43(78.2) | 11.94 | 32.49 | 1.2E-08 | 3E-07 |
| C1-2-5 | 18 | 188 | 4(7.7) | 17(30.9) | 5.37 | 9.13 | 0.0022* | 0.040 |
| C1-3-1 | 9 | 291 | 10(19.2) | 27(49.1) | 4.05 | 10.53 | 0.0012 | 0.011 |
| | | 303 | 14(26.9) | 6(10.9) | 0.33 | 4.51 | 0.034 | 0.31 |

*:Fisher's exact test

**Table 3 Statistically significant alleles associated with Behçet disease
in an Italian population**

| Marker | No of alleles | allele | Cont(%) | Pat(%) | R.R. | χ^2 | p | P c |
|---------|---------------|--------|-----------|----------|-------|----------|---------|-------|
| | | | N=28 | N=22 | | | | |
| C1-2-A | 12 | 256 | 5(17.9) | 0(0.0) | 0.09 | 4.37 | 0.0046* | 0.56 |
| MICA-TM | 5 | A6 | 16(57.1) | 17(77.3) | 2.55 | 0.14 | 0.14 | 0.68 |
| MIB | 14 | 348 | 5(17.6) | 12(54.5) | 5.52 | 7.39 | 0.0076* | 0.11 |
| | | 350 | 13(46.4) | 4(18.1) | 0.26 | 4.38 | 0.035* | 0.49 |
| C1-4-1 | 5 | 217 | 18(64.3) | 20(90.9) | 5.56 | 4.79 | 0.029 | 0.15 |
| | | 221 | 12(42.9) | 3(13.6) | 0.21 | 5.01 | 0.025* | 0.13 |
| HLA-B | 24 | B51 | 6(21.4) | 15(68.2) | 7.86 | 11.05 | 0.0009 | 0.021 |
| C1-2-5 | 18 | 202 | 0(0.0) | 5(22.7) | 17.91 | 7.07 | 0.012* | 0.22 |
| | | 210 | 9(32.1) | 2(9.1) | 0.21 | 3.82 | 0.051* | 0.92 |
| C1-3-1 | 8 | 291 | 3(10.7) | 7(31.8) | 3.89 | 3.43 | 0.068* | 0.54 |
| C3-2-11 | 18 | 213 | 3(10.7) | 10(45.5) | 6.94 | 7.73 | 0.068* | 0.12 |

*: Fisher's exact test

これらのうち、MIB*348 アリルが最も強く相関していた（日本人： $P_c=0.000014$ ，ギリシャ人： $P_c=0.00047$ ，イタリア人： $P_c=0.11$ ）が、HLA-B51 抗原との相関の方が、統計学的有意差を示した（日本人： $P_c=0.000000000017$ ，ギリシャ人： $P_c=0.00000032$ ，イタリア人： $P_c=0.021$ ）。しかしながら、これらの3つのマイクロサテライトアリル（MICA*A6, MIB*348, C1-4-1*217）は HLA-B51 と互いに強く連鎖している（互いに交絡因子である）ため、HLA-B51 遺伝子の存在（影響）を無視して、マイクロサテライトアリルのリスク比を算出すること、また逆にこれらのマイクロサテライトの存在（影響）を無視して HLA-B51 のリスク比を算出することは危険であることから、これらの交絡因子を考慮した層別解析をする必要がある。そこで、3つの各マイクロサテライトアリルの本病への第一義的な影響の有無を調べるため、HLA-B51 抗原陽性群と HLA-B51 陰性群にわけて（層別し）、Mantel-Haenszel 法により共通オッズ比 (Weighted OR) を推定し、95% 信頼区間(95%CI)を求めた。その結果、どのマイクロサテライトアリルにおいても有意な影響があるとは断定できなかった。しかしながら、逆に HLA-B51 抗原の本病への第一義的な影響の有無を調べるため、これらの3つの各マイクロサテライトアリルにおいて、その陽性群と陰性群に層別して、同様に共通オッズ比を推定し 95%信頼区間を求めたところ、どの民族においても顕著な有意値を示し、HLA-B51 抗原は疾患の罹患に最も強い影響を及ぼすと考えられた (Table 4)。

また、HLA-B 遺伝子およびこれら 8 種類の各マイクロサテライト座において、患者群と対照群で各アリル分布の遺伝的偏りを Markov Chain 法を用いて計算した (Table 5)。その結果、日本人では HLA-B 遺伝子および3つのマイクロサテライト (MICA/TM, MIB, C1-2-5) 座で患者群は対照群に比べて顕著な遺伝的偏りを示した (Table 5)。ギリシャ人、イタリア人ではサンプル数は日本人に比べて少ないが、HLA-B 遺伝子のみは有意な遺伝的偏りを示した (Table 5)。これらの結果から HLA 領域の本病原因遺伝子は HLA-B 遺伝子そのもの、もしくは HLA-B 遺伝子の極々近傍に座位することが示唆された。しかしながら、HLA-B51 抗原陰性の本病患者群は各民族でおよそ 4 割近く存在している。これらに関しては、外来となる外来抗原（ウイルスなど何らかの微生物）の相違、同一外来抗原上の異なるアグレトープの関与もしくは HLA 領域以外に存在する他の疾患感受性遺伝子の影響などが考えられる。

Table 4 Association of HLA-B51 with BD stratified for the effect of MICA/A6, MIB/348 or C1-4-1/217 in Japanese, Greek and Italian populations

| | Weighted Odds Ratio (OR) | χ^2 | P | 95% CI |
|-------------------|-----------------------------|----------|---------|---------------|
| (Japanese) | | | | |
| MICA/A6 | 11.20 | 34.50 | 4.3E-09 | 4.88<OR<25.72 |
| MIB/348 | 8.98 | 26.40 | 2.8E-07 | 3.63<OR<22.21 |
| C1-4-1/217 | 7.95 | 38.28 | 6.1E-10 | 4.05<OR<15.59 |
| (Greek) | | | | |
| MICA/A6 | 10.53 | 26.5 | 2.6E-07 | 4.19<OR<26.43 |
| MIB/348 | 11.21 | 29.41 | 5.9E-08 | 4.55<OR<27.57 |
| C1-4-1/217 | 9.76 | 23.37 | 1.3E-06 | 3.87<OR<24.60 |
| (Italian) | | | | |
| MICA/A6 | 13.39 | 7.95 | 0.00481 | 2.25<OR<79.64 |
| MIB/348 | 5.15 | 2.82 | 0.09302 | 1.05<OR<25.40 |
| C1-4-1/217 | 6.00 | 4.94 | 0.02623 | 1.47<OR<24.55 |

Table 5 Genotypic differentiation between the normal and patient groups in Japanese, Greek and Italian populations

| Marker | Japanese | Greek | Italian |
|---------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | (Cont.=132, BD=95) | (Cont.=52, BD=55) | (Cont.=52, BD=55) |
| | P value \pm s.e. | P value \pm s.e. | P value \pm s.e. |
| C1-2-A | 0.38152 \pm 0.00065 | 0.10262 \pm 0.00070 | 0.22331 \pm 0.00076 |
| MICA-TM | 0.00001 \pm 0.00000 | 0.09689 \pm 0.00121 | 0.10818 \pm 0.00020 |
| MIB | 0.00000 \pm 0.00000 | 0.21318 \pm 0.00219 | 0.06013 \pm 0.00097 |
| C1-4-1 | 0.00080 \pm 0.00004 | 0.00904 \pm 0.00033 | 0.07663 \pm 0.00017 |
| HLA-B | 0.00007 \pm 0.00001 | 0.00180 \pm 0.00006 | 0.00691 \pm 0.00017 |
| C1-2-5 | 0.00000 \pm 0.00000 | 0.11846 \pm 0.00176 | 0.05625 \pm 0.00080 |
| C1-3-1 | 0.00036 \pm 0.00003 | 0.16974 \pm 0.00064 | 0.20040 \pm 0.00055 |
| C2-4-4 | 0.00328 \pm 0.00003 | 0.55011 \pm 0.00092 | 0.18600 \pm 0.00063 |
| C3-2-11 | 0.12252 \pm 0.00078 | 0.61326 \pm 0.00118 | 0.22746 \pm 0.00082 |

[参考文献]

- 6 Ota M, Mizuki N, Katsuyama Y, et al: The critical region for Behçet disease in the human MHC is reduced to a 46 kb segment centromeric of HLA-B by association analysis using refined microsatellite mapping. *Am J Hum Genet* 1999 ; in press.
- 7 Raymond M, Rousset F : Genepop (version 1.2): population genetics software for exact test and ecumenicism. *J Hered* 1995; 86: 28-249.
Mizuki N, Ando H, Kimura M, et al: Nucleotide sequence analysis of the HLA class I region spanning the 237 kb segment around the HLA-B and -C genes. *Genomics* 1997; 42: 55-66.
- 8 Shiina T, Tamiya G, Oka A, et al. Nucleotide sequencing analysis of the 146 kb segment around the *IkLB* and *MICA* genes at the centromeric end of the HLA class I region. *Genomics* 1998; 47: 372-382. Shiina, T, Tamiya G, Oka A, et al. Genome sequencing analysis of the 1.8 Mb entire human MHC class I region. *Immunological Review* 1999; in press.

[研究業績]

1. Mizuki, N., Ota, M., Kimura, M., Ohno, S., Ando, H., Katsuyama, Y., Yamazaki, M., Watanabe, K., Goto, K., Nakamura, S., Bahram, S., Inoko, H.: Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the *MICA* gene: A strong association of six GCT repetitions with Behçet disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997;94:1298-1303
2. Ota, M., Katsuyama, Y., Mizuki, N., Ando, H., Furihata, K., Ohno, S., Pivetti-Pezzi, P., Tabbara, K.F., Palimeris, G.D., Nikbin, B., Davatchi, F., Chams, H., Geng, Z., Bahram, S., Inoko, H.: Trinucleotide repeat polymorphism within exon 5 of the *MICA* gene (MHC class I chain-related gene A): allele frequency data in the nine population groups Japanese, Northern Han, Hui, Kazakhstan, Iranian, Saudi Arabian, Greek and Italian. *Tissue Antigens* 1997;49:448-454.
3. Goto, K., Ota, M., Ohno, S., Mizuki, N., Ando, H., Katsuyama, Y., Maksymowych, W.P., Kimura, M., Bahram, S., Inoko, H.: *MICA* gene and ankylosing spondylitis: linkage analysis via a transmembrane-encoded triplet repeat polymorphism. *Tissue Antigens* 1997;49:503-507.
4. Ando, H., Mizuki, N., Ota, M., Yamazaki, M., Ohno, S., Goto, K., Miyata, Y.,

- Wakisaka, K., Bahram, S., Inoko, H. : Allelic variants of the human MHC class I chain-related B gene (MICB). *Immunogenetics* 1997;46:499-508.
5. Mizuki, N., Ohno, S., Ando, H., Sato, T., Imanishi, T., Gojobori, T., Ishihara, M., Ota, M., Geng, Z., Geng, L., Li, G., Kimura, M., Inoko, H. : Major histocompatibility complex class II alleles in Kazak and Han populations in the Silk Route of northwestern China. *Tissue Antigens* 1997; 50:527-534.
 6. Goto, K., Ota, M., Ando, H., Mizuki, N., Nakamura, S., Inoue, K., Yabuki, K., Kotake, S., Katsuyama, Y., Kimura, A., Inok, H., Ohno, S. : MICA gene polymorphisms and HLA-B27 subtypes in Japanese patients with HLA-B27-associated acute Anterior Uveitis. *IOVS* 1998;39:634-637
 7. Tamiya, G., Ota, M., Katsuyama, Y., Shiina, T., Oka, A., Makino, S., Kimura, M., Inoko, H. Twenty-six new polymorphic microsatellite markers around the HLA-B, -C and -E loci in the human MHC class I region. *Tissue Antigens* 1998;51:337-346
 8. Yabuki, K., Mizuki, N., Ota, M., Katsuyama, Y., Palimeris, G., Stavropoulos, C., Koumantaki, Y., Spyropoulou, M., Giziaki, E., Kaklamani, V., Kaklamani, E., Inoko, H, Ohno, S. : Association of MICA gene and HLA-B*51 with Behçet disease in Greece. *IOVS* 1999; in press.
 9. Ota, M, Mizuki, N., Katsuyama, Y., Tamiya, G., Shiina, T., Oka, A., Ando, H., Kimura, M., Goto, K., Ohno S., Inoko, H. *Am J Hum Genet* 1999; in press

ベーチェット病と自己ストレス蛋白特異的Tヘルパー1細胞

坂根 剛 (聖マリアンナ医大、難病治療研究センター)
鈴木 登 (聖マリアンナ医大、難病治療研究センター)
永渕裕子 (聖マリアンナ医大、難病治療研究センター)
岳野光洋 (聖マリアンナ医大、難病治療研究センター)

【研究要旨】 ベーチェット病(B病)の自己ストレス蛋白(HSP)に対する免疫反応を解析した。その結果、B病患者リンパ球はHSP由来ペプチド、HU18 (336-351) に特異的に反応し、特に眼病変増悪期にはHU18特異的T細胞がクローン性に拡大することを明らかにした。さらに、Hu-18刺激末梢血リンパ球によるサイトカイン産生性は活動性とよく相関し、活動期にはTh1型および炎症性サイトカインが主体であるのに対し、非活動期にはTh2型および/あるいはTh3型サイトカインが検出された。また、B病患者では、病変部だけでなく、末梢血白血球にもHSP60の恒常的な発現亢進が観察された。このことはB病では標的自己抗原が常に補填されて、抗HSP免疫応答が部分的に活性化された状態にあり、疾患の再燃性の基盤を形成していることを意味している。

【研究目的】 最近、B病の病因に自己免疫の関与することが提唱されている。これまで、我々および英国のLehnerらは、B病患者、特に眼病変を持つ患者のT細胞がヒトHSP由来の特定のペプチドに強く反応することを示し、病態との関連を指摘した¹⁻³⁾。我々は本年度、ヒトHSP由来ペプチド、HU18に対するB病患者の免疫応答と疾患活動性の関連をサイトカイン産生性を中心にして解析した。

【研究方法】 (1)対象：厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班の作成した臨床診断基準(1987)を満たすベーチェット病患者26例。男性10例、女性16例、平均年齢±SD 42.3±11.2才。活動性患者6例、非活動性患者20例。健常者12名を対照とした。

(2)末梢血リンパ球をHSP由来ペプチドで7日間刺激し、増殖反応をトリチウム標識チミジンの取り込みで解析した。抗原特異的に増殖するT細胞のT細胞レセプターVβファミリーは蛍光抗体法で同定し、そのVβ鎖のCDR3領域のcDNA配列を解析した。

(3)末梢血リンパ球をHSP由来ペプチドで24時間刺激し、その上清中のサイトカインをELISA法により測定した。

(4)皮膚病変局所(結節性紅斑)のサイトカイン産生細胞、HSP発現細胞を免疫染色法により検討した。

【結果および考案】 (1)ヒトHSP60由来ペプチドに対するT細胞の反応性：B病患者T細胞は、ヒトHSPの中でも細菌HSPと相同性の高いペプチド断片(336-351)、HU18刺激に対して特異的に増殖反応を示した。特にその反応性は眼症状と相関した(図1)。

(2)HU18刺激T細胞のクロナリティー：個々の患者でHU18刺激により特定のVβを持つT細胞が増加した(図2a)。Vβ5a陽性T細胞の増殖が認められた患者YWのVβ5a陽性T細胞のβ鎖CDR3領域のcDNAの配列を解析した結果、21クローンのうち18クローンまでが同一であり、他の3クローンも極めて類似したアミノ酸配列を示した(図2b)。この成績は、HU18に抗原特異的な様式で反応するT細胞が病態に関与することを示している。

(3)HU18刺激末梢血単核細胞のサイトカイン産生性：患者末梢血単核細胞をHU18で刺激すると、多様なサイトカインの産生が認められたが(図3)、活動性とは次のような関連が認められた。活動性症例では、IL-12産生が高く、これと相関してTNF- α およびIFN- γ の産生が亢進していた(図4)。IL-12産生細胞は主としてB細胞であり、HU18に感作されたB細胞によって産生されていると考えられた。また、HU18反応性T細胞はTh1型細胞に選択的に発現するIL-12レセプター β 2鎖を発現していた。一方、非活動性症例においては、IL-4、IL-10、TGF- β などのTh2、Th3型の抑制性サイトカインの産生が認められた。また、これらの抑制性サイトカインを*in vitro*で活動性患者の末梢血単核細胞に添加すると、HU18に対する増殖反応は抑制された。このようにB病患者ではT、B細胞いずれのポピュレーションにもHU18特異的リンパ球が存在し、これらのリンパ球によるTh1型サイトカインの産生が活動期の病態を形成すると考えられた。

(4)皮膚組織病変のサイトカイン産生：結節性紅斑の病変部位では浸潤単核細胞に一致して、IL-12、IFN- γ 、TNF- α が免疫組織染色法により検出された。また、病変消退時にはIL-4、IL-10、TGF- β などのサイトカインも産生されていた。すなわち、病勢とTh1/Th2サイトカイン産生パターンの関連は末梢血単核細胞レベルだけでなく、病変局所でも観察された。

(5)HSP60の発現：B病患者の皮膚組織病変には、アトピー性皮膚炎の病変には観察されないHSP60の発現が免疫組織染色で検出された。また、健常者の白血球では、*in vitro*の熱ショックなどによりHSP60の発現が誘導されるのに対し、B病患者末梢血単核細胞、好中球においてはmRNAおよび蛋白レベルで構成的にHSP60が発現していた。

【結論】 B病患者リンパ球は細菌HSPと高い相同性をもつヒトHSPペプチド断片に強く反応することから、B病の病態には細菌由来のHSPと自己HSPの交差反応による自己免疫機序が関与すると考えられる。しかも、B病患者では標的抗原である自己HSPが皮膚や白血球に構成的に発現しているため、抗HSP免疫は常に部分的に活性化された状態にあり、本来は不顕性細菌感染のような低レベルの刺激により抗HSP免疫はさらに増強し、容易に活動性症状が繰り返し出現するものとする。HSPに対する免疫応答によるサイトカイン産生性は疾患活動期には、IL-12、TNF- α をはじめとしたTh1型を示し、非活動期にはTh2および/あるいはTh3型のサイトカインも検出された。これらの成績は、サイトカインの動態追跡が疾患活動性の把握に有用であることを示すとともに、Th1型サイトカインの制御がB病の治療標的のひとつであることを示している。

【参考文献】

- 1) S Kaneko, N Suzuki, N Yamashita, et al.: Clin. Exp. Immunol. 108: 204-212, 1997
- 2) T Lehner.: Int. Rev. Immunol. 14:21-32, 1997
- 3) T Sakane.: Int. Rev. Immunol. 14:89-96, 1997

図1. 末梢血単核細胞のHU18刺激に対する増殖反応

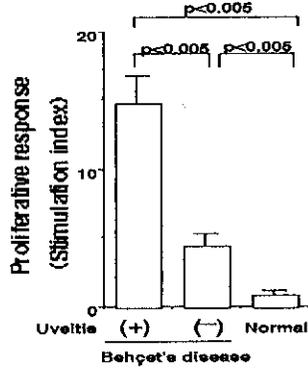
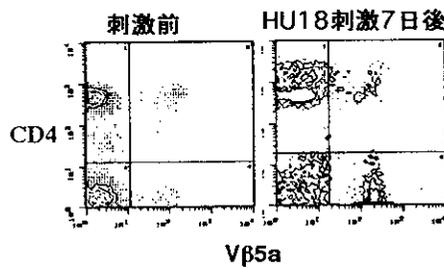


図2. HU18刺激によるVβ5a陽性T細胞のクローン性増殖

a) Vβ5a陽性T細胞の増大



b) Vβ5a CDR3領域のcDNA塩基配列

| Vβ5.2 | CDR3 regions | Cβ | Clones |
|-------|--------------------------|----|-----------------|
| | DTGTGRNQKLFFGSGTQLSVL | | 18 clones |
| | DTGTGSVINKLFFWAVGNPFSCLG | | One clone |
| | LYPLGSGPTDTQYFGPGTRLTVL | | One clone |
| | GGAGRSPDTQYFGPGTRLTVL | | One clone |
| | | | Total 21 clones |

図3. 末梢血単核細胞のHU18刺激に対するサイトカイン産生

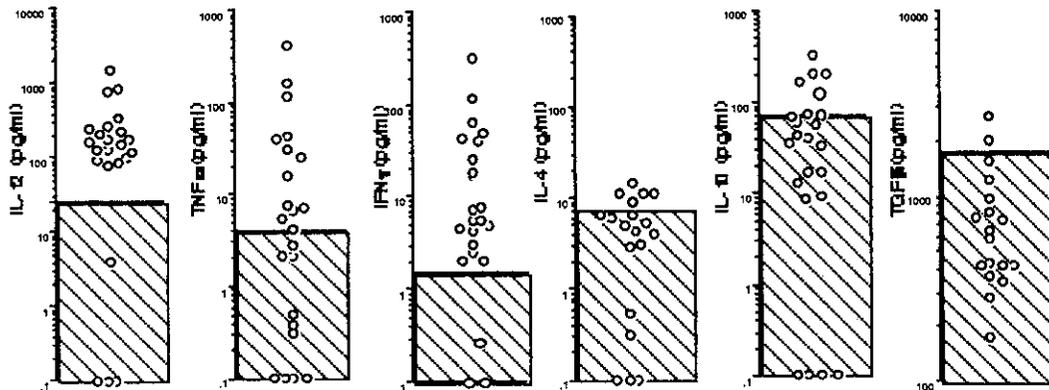
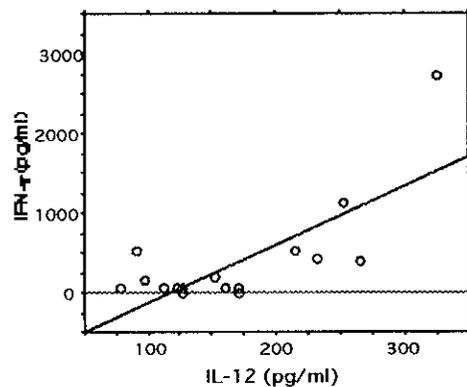


図4. 末梢血単核細胞のHU18刺激に対するIL-12とIFN-γの相関



ベーチェット病患者好中球におけるサイトカインの自発的産生

坂根 剛 (聖マリアンナ医大、難病治療研究センター)
岳野光洋 (聖マリアンナ医大、難病治療研究センター)
下山義博 (聖マリアンナ医大、難病治療研究センター)

【研究要旨】好中球の機能過剰はベーチェット病 (B病) の基本病態であり、これまで、好中球の遊走能、活性酸素産生能などエフェクター細胞としての機能亢進が指摘されてきた¹⁾。本研究では、B病患者の好中球は寛解期においてもTNF- α を中心とした炎症性サイトカインを自発的に産生し、オートクラインの機序により、好中球自身をプライミングして、アポトーシス抵抗性を賦与することを明らかにした²⁾。さらに、活動期にはIL-12やIL-18を産生し、Th1型細胞やNK細胞の活性化を促して、B病のTh1型免疫応答による病態形成に関与していると考えた。

【研究目的】B病の病態の中樞を形成する好中球の機能過剰に随伴して起こるサイトカイン産生能を解析し、その異常が好中球自身の活性化状態、細胞死あるいは他の免疫担当細胞との相互作用にどのように関連し、悪循環の回転を形成しているかのを明らかにする。

【研究方法】(1)対象：厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班の作成した臨床診断基準(1987)を満たすB病患者17例。男性9例、女性8例、平均年齢 \pm SD 42.3 \pm 11.2才。活動期7例、非活動期10例。健常者12名を対照とした。

(2)末梢血好中球を二重フィコール遠心法により分離し、RNAを抽出し、IL-1 α 、IL-8、IL-12、IL-18、TNF- α のmRNAの発現をRT-PCR法により解析した。

(3)好中球を非刺激で24時間培養し、上清中に分泌されるサイトカイン (IL-8、IL-12)の濃度をELISA法により測定した。

(4)好中球を*in vitro*でTNFあるいはLPSで刺激し、核蛋白を抽出し、ゲルシフト法によりNF- κ Bの核内移行を検討した。

【結果】(1)B病好中球の自発的サイトカインの産生：健常者好中球では、微弱なIL-8mRNAの自発的な発現を認めたが、IL-8以外のサイトカインはmRNAおよび蛋白レベルで検出されず、LPS刺激により炎症性サイトカインのmRNAの発現が誘導された。これに対して、B病患者好中球はIL-8、IL-1 α 、TNF- α のmRNAを自発的に発現していた。これらのサイトカインの自発的産生は、非活動期にある患者を含めほとんどの患者好中球で確認された。さらに、活動性症例、臓器病変を伴う患者の好中球ではIL-18のmRNAの発現と活性化型IL-12p70の産生が認められた (図1、表1)。患者由来の好中球の培養上清を抗CD3抗体刺激T細胞に添加すると、著明なインターフェロン- γ 産生が誘導された。この結果は、B病好中球は単にエフェクター機能が過剰であるだけでなく、特に活動期においては、Th1指向性のサイトカインを産生することにより、炎症の惹起、増幅に作用していることを示唆するものである。

(2)B病患者好中球のNF- κ Bの核内移行：健常者好中球ではTNF刺激依存性にNF- κ Bが活性化されるのに対し、B病患者では分離直後の好中球ですでにNF- κ Bの核内移行が観察された (図2)。このことは患者好中球が生体内ですでに一定の活性化状態にあることを示す

とともに、好中球自身が産生するTNF- α などの炎症サイトカインがオートクラインの様式で自己活性化に関与していることを支持する成績である。また、昨年度報告したように、TNF- α は好中球のアポトーシスの抑制にも関わっている。これらの成績をまとめると、B病患者では*in vivo*でプライミングされ、機能亢進状態にある好中球が大量に蓄積されており、何らかの増悪機転が作用したときに局所に動員され、急性炎症の形成に関与するものと考えられる。

【結論】 B病において、好中球は非活動期であってもIL-8、IL-1 α 、TNF- α の自発的産生が亢進しており、オートクラインの機序で好中球自身をプライミングし、B病の基本病態である過敏性は皮膚のみならず、免疫学的にも成立していることが明らかになった。さらに、活動期には、好中球は炎症局所でエフェクター細胞として機能するだけでなく、IL-12、IL-18などのTh1指向性のサイトカインを産生し、炎症の増幅に寄与していると考えた。

【参考文献】

- 1) M Takeno, A Kariyone, et al: Arthritis Rheumatism 38:426-233, 1995
- 2) WC Liles, PA Kiener et al.: J. Exp. Med. 184: 429-440, 1996

図1. 患者好中球の炎症性サイトカインのmRNAの発現

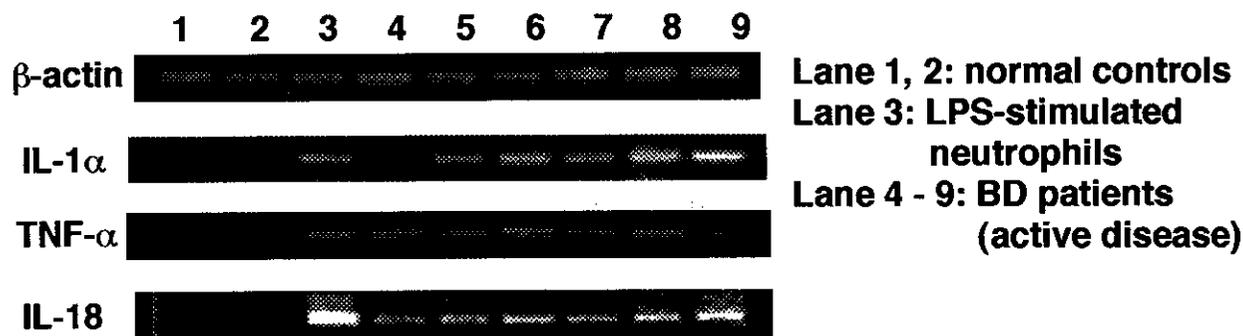
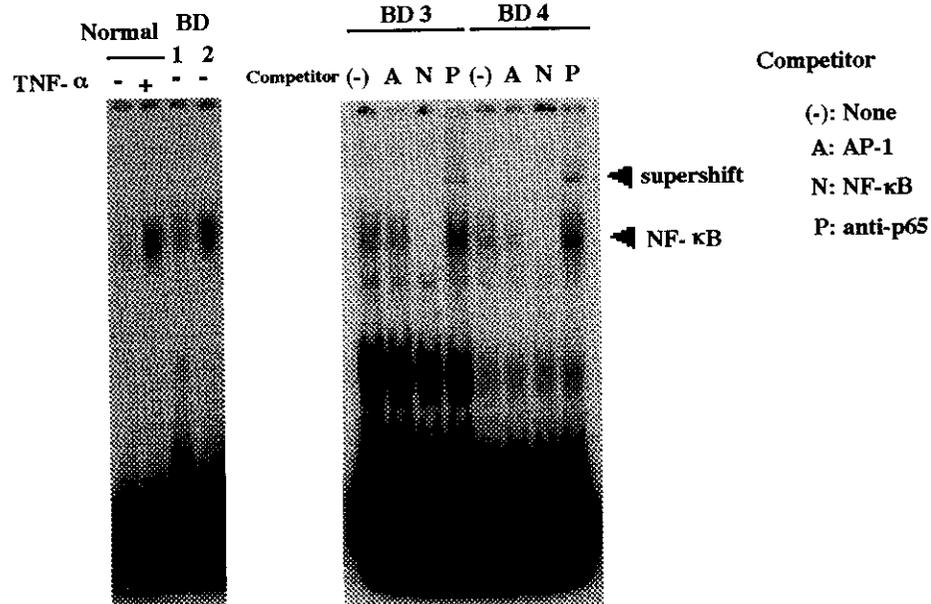


表1. 患者好中球の自発的サイトカイン産生と臨床活動性

| cytokine | | | | disease activity | |
|----------|-------|---------------|---------------|------------------|-----------------|
| IL-12 | IL-18 | TNF- α | IL-1 α | active (n=7) | inactive (n=10) |
| + | + | + | + | 6 | 0 |
| + | - | + | + | 0 | 2 |
| + | - | - | - | 1 | 0 |
| - | + | + | + | 0 | 1 |
| - | - | + | + | 0 | 5 |
| - | - | - | - | 0 | 2 |

図2. 患者好中球のNF-κBの異常活性化



進行性神経ベーチェット病に対するメソトレキセート 少量パルス療法 —2年間の治療成績—

橋本 喬史 (帝京大学医学部内科)
一志 邦夫 (帝京大学医学部内科)
河井 舞美 (帝京大学医学部内科)
菊地 弘敏 (帝京大学医学部内科)
須田 洋子 (帝京大学医学部内科)
広畑 俊成 (帝京大学医学部内科)

KEYWORDS= 神経ベーチェット病、メソトレキセート、
脳脊髄液 IL-6、長期治療成績

【目的】我々は進行性神経ベーチェット病に対するメソトレキセート (MTX) 少量パルス療法の有効性及び安全性につき検討してきた。今回さらに症例を加え、2年間の長期治療成績について検討した。

【対象】進行性の精神神経症状を有するベーチェット病患者9例 (完全型6例、不全型3例、男：女=7:2、年齢 48.7 ± 13.2 [mean \pm SD]) を対象とした。MTX を5~10mg/週より開始し、髄液 IL-6が0.1U/ml 以下に低下するまで2週毎に投与量の増量を行い、これを維持量とした。投与開始1年および2年後の時点において精神神経所見、髄液 IL-6、IQ 値、MRI 所見の変化及び副作用について評価した。

【結果】1年間の MTX 投与後、全体的に髄液 IL-6値の有意な低下が認められた。一方、IQ 及び MRI 所見に関しては MTX 投与前に比し有意な変化は認められなかった。治療開始2年後にも同様の検討をしたところ、髄液 IL-6の低下を維持した例が多かったが、2例では髄液 IL-6が上昇し神経症状も進行した。副作用としては2年間で9例中4例に肝障害が認められたが、MTX の減量・葉酸投与により軽快し、その後も投与継続が可能であった。症状が安定していた1例では MTX の減量が可能であった。また、2例で MTX の投与を中止をしたが、1例は他薬剤による間質性肺炎・血小板減少を発症し、もう1例は痴呆悪化のため内服困難となったため、MTX の副作用のために中止したものではなかった。

【考案】進行性ベーチェット病に対する MTX 少量パルス療法は、髄液 IL-6の上昇に反映される中枢神経内の免疫反応を抑制して有効性を発揮するものと考えられる。今後

さらに長期間経過を観察して治療効果を確認し、MTX減量・中止の可能性について検討していく予定である。

Low dose weekly methotrexate therapy for progressive neuro-Behcet's disease.

Takashi Hashimoto (Teikyo university school of medicine, Department of internal medicine), Kunio Isshi (Teikyo university school of medicine, Department of internal medicine), Mami Kawai (Teikyo university school of medicine, Department of internal medicine), Hirotohi Kikuchi (Teikyo university school of medicine, Department of internal medicine), Hiroko Suda (Teikyo university school of medicine, Department of internal medicine), Shunsei Hirohata (Teikyo university school of medicine, Department of internal medicine),

【 Purpose 】 Since there has been no effective treatment for progressive neuro-Behcet's disease (NB), an open trial was designed to investigate the efficacy and safety of low dose weekly methotrexate (MTX) therapy for progressive NB.

【 Patients and Methods 】 Nine patients who satisfied the 1982 Japanese diagnostic criteria for Behcet's disease, whose neuropsychiatric manifestations were judged to be progressive (7 males and 2 females, aged 48.7 ± 13.2 years) were given oral MTX until the end of the 24 month trial. The initial dose of MTX was 5–10mg/week, and the dose was increased every two weeks up to 10–12.5mg/week until CSF IL-6 levels were decreased below 0.1U/ml. The clinical responses of the patients to MTX were judged by careful neuropsychiatric evaluations, WAIS-R, brain MRI scans, serum IL-6 and cerebrospinal fluid (CSF) IL-6 levels.

【 Results 】 After the 12 month trial, CSF IL-6 levels were found to be significantly decreased in all 9 patients. Though CSF IL-6 levels still remained low levels after 24 month trial, two patients showed exacerbation of neuropsychiatric manifestations along with the elevation of CSF IL-6 levels. The findings on MRI scans and intelligence quotient (WAIS-R) were not significantly worsened after the 24 month trial compared with those before the trial. Four of nine patients presented with mild liver dysfunction, which returned to normal by decreasing the dose of MTX or the administration of oral folic acid.

【 Conclusion 】 The results in the current studies suggested that low dose weekly MTX therapy might have a beneficial effect in the treatment of patients with progressive neuro-Behcet's disease. Thus, it prevented the progression of the neuropsychiatric manifestations

by markedly decreasing CSF IL-6 levels. A trial for a longer period would be necessary to confirm the efficacy and safety of MTX in the treatment of progressive NB.

【はじめに】副腎皮質ステロイド薬をはじめとする治療に抵抗して中枢神経病変が持続進行しついに痴呆に陥る進行性神経ベーチェット病は、ベーチェット病の最も難治な病態の一つであり、この病態に対する治療法の確立は緊急を要する研究課題となっている。メソトレキセート (MTX) 少量パルス療法が神経ベーチェット病の症状進行の抑制に有効であり、治療を中止すると再び症状が進行したことからその有効性が期待される。今回は進行性神経ベーチェット病に対する MTX 少量パルス療法の有効性及び安全性に関してさらに症例を加え2年間の治療成績について検討した。

【患者と方法】本研究は1996年2月から当科を受診した進行型神経ベーチェット病患者を対象として治験をおこなった。対象症例は厚生省の診断基準に加えて、(1) 進行性精神神経症状を有す、(2) 脳脊髄液 IL-6の上昇がある、(3) クレアチニンクリアランス (Ccr) が10ml/min 以上である、の3条件を満たす9症例である (表1)。対象症例の平均年齢は 48.7 ± 13.2 歳 [mean \pm SD]

で完全型6例、不全型3例であり、全例 HLA-B51陽性であった。いずれも緩徐進行性の精神神経症状を有し、9例中6例の患者に知能低下が認められ、その他の神経症状として構音障害、歩行障害、不随意運動、インポテンツなどを伴っていた。既往の治療

として副腎皮質ステロイド、コルヒチンの他にシクロホスファミドパルス療法、ミゾリビン、アザチオプリン等の免疫抑制剤の投与が行われていた。

担当医は本研究に際し、試験内容、予期される副作用、他の治療等について説明し、被験者の本研究への参加の自由意志による同意を文書で得た。

投与方法は、MTX 初回投与量として5~10mg/週より経口投与を開始した。髄液 IL-6値を目安に MTX は2週ごとに2.5mg/週ずつ漸増し、最終的に髄液 IL-6値が0.1U/ml 以下となるところで維持量とした。なお、併用薬剤については免疫抑制剤の投与が行われている場合は中止とし、その他の治療薬剤については投与量を含めて変更は行わない

表 1 対象症例

| | 症例1 | 症例2 | 症例3 | 症例4 | 症例5 | 症例6 | 症例7 | 症例8 | 症例9 |
|---------------|-----------------|--|----------------------|---------------------------------------|----------------------|-------------------------|--|------------------|------------------|
| 年齢 | 55歳 | 61歳 | 51歳 | 44歳 | 58歳 | 56歳 | 29歳 | 35歳 | 50歳 |
| 病型 | 完全型 | 完全型 | 不全型 | 完全型 | 完全型 | 完全型 | 完全型 | 不全型 | 不全型 |
| 発病年齢 | 39歳 | 47歳 | 34歳 | 30歳 | 46歳 | 50歳 | 21歳 | 28歳 | 33歳 |
| 神経症状発症年齢 | 46歳 | 54歳 | 43歳 | 40歳 | 51歳 | 58歳 | 23歳 | 35歳 | 38歳 |
| 症状 | 知能低下 精神症状 | 知能低下 精神症状 | 知能低下 精神症状 歩行障害 | 知能低下 精神症状 不随意運動 | 知能低下 精神症状 構音障害 | 知能低下 | 歩行障害 構音障害 | インポテンツ 構音障害 | 歩行障害 構音障害 |
| 既往治療 | PSL 30mg/day | PSL 60mg/day IVCP 0.5g x 4 Mizoribine 150mg/day | PSL 15mg/day | PSL10~ 60mg/day AZ 100mg/day | PSL 10mg/day | COL 1.0mg/day CyA | COL 0.3mg/day PSL 60mg/day CyA | COL 1.5mg/day | COL 1.5mg/day |
| 現在のPSL 使用量 | 10 mg/day | | | 10 mg/day | 5 mg/day | | | | |