

B. 研究方法

〔対象〕日本人の本病患者96人、ギリシャ人の本病患者55人、イタリア人の本病患者21人およびサウジアラビア人の本病患者13人（計185人）を対象とした。これらと比較検討するため日本人健常者132人、ギリシャ人健常者52人、イタリア人健常者28人、サウジアラビア人健常者18人（計230人）を健康対照群とした。

〔血清学的HLAタイピング〕

NIH標準法の補体依存性リンパ球傷害試験により血清学的HLAクラスⅠタイピングを行った。

〔HLA-B51アレルタイピング〕

HLA-B51陽性となった検体については、HLA-B51アレルタイピングをPCR-SBT (polymerase chain reaction-sequence based typing) 法にて行った。すなわち、HLA-B遺伝子第2, 3エクソン領域を挟むプライマー (5' primer: CCG AGG ACG GAG CCC CGG; 3' primer: CCC ACT GCC CCT GGT ACC) をデザインし、PCR法にて特異的に増幅した。このプライマーはHLA-B51アレル9個全てとHLA-B*18, B*35, B*37, B*52, B*53, B*58, B*78を特異的に増幅する。PCR産物をMicron 100 (Millipore, MA)にて精製後、ABI PRISM BigDye terminator cycle sequencing kit (PE Biosystems)と蛍光自動シーケンサーを用いたcycle-sequencing法にてその全塩基配列を決定することにより、HLA-Bアレルタイピングを行った。シーケンシングプライマーはPCRプライマーと同一である。

（倫理面への配慮）

各民族の本病患者および健常者1人1人に対し、本研究の主旨を説明し、遺伝子解析を行うことに対する同意を得た上で採血を行った。

C. 研究結果

〔血清学的HLAタイピング〕

表1に示すように、HLA-B51抗原頻度は、日本人では患者群で59.4%、対照群で13.6% (Pc値=0.00000000000098, 相対危険率[RR]=9.3)、ギリシャ人では患者群で77.8%、対照群で23.1% (Pc値=0.00000032, RR=11.9)、イタリア人では患者群で71.4%、対照群で17.9% (Pc値=0.0042, RR=11.5)、サウジアラビア人では患者群で76.9%、対照群で22.2% (Pc値=0.076, RR=11.7)と各民族ともに患者群で顕著に上昇していた。

〔HLA-B51アレルタイピング〕

日本人ではHLA-B51陽性患者57人中56人が、HLA-B*5101アレル(98.2%)であり、残りの1人はHLA-B*5102アレル(1.8%)であった。日本人の対照群ではHLA-B51陽性者が18人おり、すべてHLA-B*5101アレル(100%)であった。両群間のHLA-B*51アレル頻度（サブタイプ分布）に有意差はなかった。日本人患者群全体に対するHLA-B*5101アレル頻度は58.3%で、HLA-B*5102アレル頻度は1.0%であった（表2）。

ギリシャ人ではHLA-B51陽性患者43人中33人(76.7%)がHLA-B*5101アレルで、13人(30.2%)がHLA-B*5108アレルであった。HLA-B51陽性患者の内3人は、HLA-B*5101とHLA-B*5108アレルの両方を持つヘテロであった。ギリシャ人患者群全体に対するHLA-B*5101アレル頻度は60.0%で、HLA-B*5108アレル頻度は23.6%であった。ギリシャ人の対照群は現在解析中であるが、現在まで8人解析して、すべてHLA-B*5101アレルであった。

イタリア人ではHLA-B51陽性患者15人中11人(73.3%)がHLA-B*5101アレルで、4人(26.7%)がHLA-B*5108アレルであった。イタリア人の対照群では

HLA-B51陽性者が5人おり、すべてHLA-B*5101アリル(100%)であった。両群間のHLA-B*51アリル頻度(サブタイプ分布)に有意差はなかった。イタリア人患者群全体に対するHLA-B*5101アリル頻度は52.4%で、HLA-B*5108アリル頻度は19.0%であり、どちらも対照群に比して有意に増加していた(表3)。

サウジアラビア人ではHLA-B51陽性患者10人中9人(90.0%)がHLA-B*5101アリルで、1人(10.0%)がHLA-B*5108アリルであった。サウジアラビア人の対照群ではHLA-B51陽性者が4人おり、すべてHLA-B*5101アリル(100%)であった。両群間のHLA-B*51アリル頻度(サブタイプ分布)に有意差はなかった。サウジアラビア人患者群全体に対するHLA-B*5101アリル頻度は69.2%で、HLA-B*5108アリル頻度は7.7%であったが、対象人数が少ないため、患者群対照群間で統計学的有意差はなかった。(表4)。

D. 考察

今回の解析で、日本人、ギリシャ人、イタリア人、サウジアラビア人において、本病患者群でHLA-B51抗原頻度が顕著に上昇していた。これらの結果は、過去の報告とほぼ一致しており、本病が人種を越えてHLA-B51抗原と関連していることが再確認された。

HLA-B51アリルタイピングでは、日本人のHLA-B51抗原が、ほとんど(98.2%)HLA-B*5101アリルにコードされており、本病患者群におけるHLA-B51抗原頻度の顕著な上昇は、HLA-B*5101アリルの顕著な増加によるものであることが判明した。一方、ギリシャ人、イタリア人、サウジアラビア人では、本病患者群におけるHLA-B51抗原頻度の顕著な上昇は、HLA-B*5101ア

リルの増加によるものばかりでなく、HLA-B*5108アリルの増加によるものもあった。

今回、ギリシャ人、イタリア人、サウジアラビア人の本病患者群ではHLA-B*5108アリルが、かなりの頻度で認められた。対照群では、どの人種でもHLA-B*5108アリルは1人もみられなかった。しかしながら、HLA-B51陽性健常者が少ないため、HLA-B51陽性者における各HLA-B*51アリル頻度(サブタイプ分布)には、どの人種でも患者群、対照群間で統計学的な有意差は認められなかった。したがって、これらの患者群におけるHLA-B*5108アリル頻度は、単にこれらの民族におけるHLA-B*5108アリル頻度を反映しているものなのかもしれない。しかしながら、ギリシャ人、イタリア人、サウジアラビア人対照群でHLA-B*5108アリルが1人もいないというのは少し賦に落ちない。本病患者群では、HLA-B*5108アリルが有意に増加している可能性も否定できない。今後さらに、HLA-B51陽性健常者の数を増やして解析する必要があると考えられた。

ところで、9個のHLA-B*51アリルの内、HLA-B*5107以外は、以前我々が提唱した本病の第一義的原因アミノ酸残基である63番目のアスパラギンと67番目のフェニルアラニンをもっている。HLA-B*5108はHLA-B*5101とアミノ酸配列が2カ所異なっている。152番目のアミノ酸残基がグルタミン酸からバリン(この変異はB*5109にもある)に、156番目のアミノ酸残基がロイシンからアスパラギン酸(この変異はB*5108特有)に置換されている。したがって、これらの部位のアミノ酸残基の置換が本病発症発症に何らかの影響を及ぼしている可能性に関しても、今後検索していく必要があると考えられた。

E. 結論

本病患者群でのHLA-B51抗原頻度の顕著な上昇は、日本人ではHLA-B*5101アリル頻度の上昇によるものであるが、ギリシャ人、イタリア人、サウジアラビア人では、HLA-B*5108アリル頻度の上昇も加わっていると考えられた。現時点では、これらの結果は、各民族におけるHLA-B51サブタイプの分布の相違によるものであり、本病はグローバルにHLA-B*51と関連していると考えられるが、今後対象人数を増やして再検討する必要があると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kera J, Mizuki N, Ota M, Katsuyama Y, Pivetti-Pezzi P, Ohno S, Inoko H: Significant associations of HLA-B*5101 and B*5108 alleles, and lack of association of class II alleles with Behçet's disease in Italian patients. *Tissue Antigens* 54: 565-571, 2000.

(表1) HLA-B51抗原頻度

	対照群	患者群	Pc値	相対危険率
日本人	13.6% (18/132)	59.4% (57/96)	0.0000000000098	9.3
ギリシャ人	23.1% (12/52)	78.2% (43/55)	0.00000032	11.9
イタリア人	17.9% (5/28)	71.4% (15/21)	0.0042	11.5
サウジアラビア人	22.2% (4/18)	76.9% (10/13)	0.076	11.7

(表2) 日本人のHLA-B*51アレル頻度

HLA	対照群 (N=132)	患者群 (N=96)	Pc値	相対危険率
HLA-B51	18 [13.6%]	57 [59.4%]	0.0000000000098	9.3
HLA-B*5101	18 [13.6%]	56 [58.3%]	0.0000000000027	8.9
HLA-B*5102	0 [0 %]	1 [1.0%]	N.S.	N.S.
HLA-B*5103	0 [0 %]	0 [0 %]		
HLA-B*5104	0 [0 %]	0 [0 %]		
HLA-B*5105	0 [0 %]	0 [0 %]		
HLA-B*5106	0 [0 %]	0 [0 %]		
HLA-B*5107	0 [0 %]	0 [0 %]		
HLA-B*5108	0 [0 %]	0 [0 %]		
HLA-B*5109	0 [0 %]	0 [0 %]		

(表3) イタリア人のHLA-B*51アレル頻度

HLA	対照群 (N=28)	患者群 (N=21)	Pc値	相対危険率
HLA-B51	5 [17.9%]	15 [71.4%]	0.0042	11.5
HLA-B*5101	5 [17.9%]	11 [52.4%]	0.29	5.1
HLA-B*5102	0 [0 %]	0 [0 %]		
HLA-B*5103	0 [0 %]	0 [0 %]		
HLA-B*5104	0 [0 %]	0 [0 %]		
HLA-B*5105	0 [0 %]	0 [0 %]		
HLA-B*5106	0 [0 %]	0 [0 %]		
HLA-B*5107	0 [0 %]	0 [0 %]		
HLA-B*5108	0 [0 %]	4 [19.0%]	0.43	14.7
HLA-B*5109	0 [0 %]	0 [0 %]		

(表4) サウジアラビア人のHLA-B*51アレル頻度

HLA	対照群 (N=18)	患者群 (N=13)	Pc値	相対危険率
HLA-B51	4 [22.2%]	10 [76.9%]	0.067	11.7
HLA-B*5101	4 [22.2%]	9 [69.2%]	0.23	7.9
HLA-B*5102	0 [0 %]	0 [0 %]		
HLA-B*5103	0 [0 %]	0 [0 %]		
HLA-B*5104	0 [0 %]	0 [0 %]		
HLA-B*5105	0 [0 %]	0 [0 %]		
HLA-B*5106	0 [0 %]	0 [0 %]		
HLA-B*5107	0 [0 %]	0 [0 %]		
HLA-B*5108	0 [0 %]	1 [7.7 %]	N.S.	N.S.
HLA-B*5109	0 [0 %]	0 [0 %]		

厚生科学研究費補助金（臨床調査研究事業）

分担研究報告書

ベーチェット病に関する調査研究

分担研究者 太田正穂 信州大学医学部法医学教室講師

ベーチェット病患者における TNFA プロモーター領域の多型解析

太田正穂 信州大学医学部法医学教室、勝山善彦 信州大学付属病院薬剤部

研究要旨

ベーチェット病では、病態として非特異的な慢性炎症症状が現れ、その原因となるサイトカインのうち TNF α が患者血清中で高値を示している。そこでベーチェット病患者の TNF α 遺伝子のプロモーター領域の多型を調べたところ、5'-flanking 領域の-863 の塩基が C から A への変異をもつアリル B の陽性者が健康人に比べて有意に多かった(P=0.009, R.R.=2.0)。

A. 研究目的

ベーチェット病発症に HLA-B51 遺伝子の存在が、遺伝学的素因として強く関与していることが報告されてきた。我々はこれまでに、HLA-B51 遺伝子そのものが第一の疾患感受性遺伝子であるのか、あるいは HLA-B 座近傍にこの病気の発症原因遺伝子が存在するのかを、HLA クラス I 領域内に見つけたマイクロサテライトによる相関解析で検討してきた。その結果 HLA-B 座とそれよりもセントロメア側にある MICA 座間 46 kb に原因遺伝子が存在する確証を得た。しかし、HLA-B 座の HLA-B51 遺伝子か、MICA 座の MICA009 遺伝子か、

どちらが優位に疾患発症に作用するかの結論は得ていない。また、これらの両遺伝子を保有していなくても疾患を発症する患者が30%程いることから、他の要因が加わりこの病気を誘発すると考えられる。

ベーチェット病は、その病態として比特異的な慢性炎症症状が見られ、種々のサイトカインが関与していると言われている。特に TNF α は活動期の有無に関わらず血清中にはつねに高値を示し、ベーチェット病では重要な炎症マーカーである。最近、この TNF α 遺伝子のプロモーター領域の多型が、TNF α 産生能と関与していることが報告された。今回 HLA クラ

ス III 領域にある TNF α 遺伝子のプロモーター領域の多型とその近傍のマイクロサテライトを用いて、ベーチェット病における疾患感受性について相関解析を行い、TNF α 遺伝子の多型がベーチェット病発症に関わるかを検討した。

B. 研究方法

ベーチェット病患者の genomic DNA は、これまで我々がマイクロサテライトによる疾患原因遺伝子の検索で報告してきたものと同じ検体を使用した。また、健常人の genomic DNA も我々の多型用のデータベースとして蓄積してあるものを使用した。

TNF α 遺伝子のプロモーター領域の多型解析は、この遺伝子の 5'-flanking 領域(-1,229 ~ +129)を PCR で増幅し、PCR 産物 1,358bp の direct sequencing により、5カ所の変異 (-1031:T-C, -863:C-A, -857:C-T, -308:G-A, -238:G-A)を調べ、5種類のアリルに分類した。

さらに、TNF α 遺伝子の近傍で、疾患と相関する遺伝子座の検討するために、クラス III 領域にあるマイクロサテライト TNFd, TNFa と D6S273, クラス II 領域で DQ 座のセントロメア一側にある TAPI マイクロサテライトを用いて相関解析を行った。多型解析は、ゲノム DNA を PCR で増幅

後、ABI sequencer を用いたフラグメント解析でアリル決定を行った。

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。TNF α 遺伝子のプロモーター領域内多型と HLA-B51 遺伝子との連鎖解析は、Mantel-Haenszel の weighted odds 値および 95%信頼区間を求めて行った。

患者 DNA、健常人 DNA を用いた多型検査は、血液採取時に informed consent を得てから行った。

C. 研究結果と考察

TNF α 遺伝子のプロモーター領域の多型は、Table1 に示すように5カ所 (-1031,-863,-857,-308,-238)の塩基置換から5種類 (アリル A:TCCGG, アリル B:CACGG, アリル C:CCCGA, アリル D:TCTGG, アリル E:TCCAG)に分類できた。HLA-B 抗原との連鎖は、アリル A は B52, B7, B44 等と、アリル B は B61, B39, アリル C は B48, B60, アリル D は B35, B54, B59 が、アリル E は B58 が強かった。

Table2 にしめすように、今回のアリル解析ではアリル B がベーチェット病患者 (40%) では、健常人 (29%) に比べ有意に増加していた (R.R.=2.0, P=0.009)。アリル B は健常人では HLA-B51 と連鎖不平衡を保っていないのに、患者群でこのアリル

の保有率が有意に増加していたことは、疾患発症と関わっている可能性が示唆された。更にこの遺伝子の周辺に存在するマイクロサテライトとの相関を調べたところ、TNF α 遺伝子の 5.5 kb テロメア側にある TNFa マイクロサテライトで、アリル 111 に患者群と健常人間で有意差を認められた (Table3, R.R.=7.7, P=0.00003)。ところが、TNF α 遺伝子の 10 kb セントロメア側にあるマイクロサテライト TNFd、さらにセントロメア側にある D6S273 マイクロサテライトでは、患者群で有意に増加するアリルは認められなかった (Table4, Table5)。また、クラス III 領域内で DQ のセントロメア側にある TAPI マイクロサテライトにおいても患者群に有意な相関を示すアリルは見られなかった (Table6)。

これまでの、一連のマイクロサテライトを用いた相関解析から、HLA 領域内で相関を示す遺伝子は、最もセントロメア側は TNF α 遺伝子で、テロメア側は、HLA-B から 912 kb テロメア側にある C3-2-11 までの間であった。この遺伝子間のなかで HLA-B51 と MICA009 に極めて強い疾患感受性を示している。

今回患者群で有意に増加している TNFa 遺伝子のプロモーター領域内のアリル B が、HLA-B51 遺伝子と

は連鎖を持たずに独立して、疾患発症に関与しているかを検討するため、アリル B と HLA-B51 の有無により有意性が変化するか、両因子を層別して Mantel-Haenszel 法による統計解析をした。その結果アリル B で層別し HLA-B51 について調べると、やはり非常に強い相関が認められた (R.R.=9.6, P=2.4x10⁻¹⁴) (Table7)。ところが、逆に HLA-51 で層別しアリル B の相関を調べると有意差を示さなかった (Table8)。このことから患者群における TNF α 遺伝子のプロモーター領域のアリル B の頻度が有意に高くなったのは、HLA-B51 遺伝子との連鎖によると考えられる。

D. 結論

ベーチェット病患者では、TNF α 遺伝子のプロモーター領域多型アリル B を統計学的に有意に保有していたが、これは、HLA-B51 遺伝子との連鎖により高くなったものと考えられた。しかし、TNF α 遺伝子の多型性と疾患重傷度との関係について今回調べることができなかったので今後の課題である。また、この数年間の HLA 領域内におけるベーチェット病における疾患発症原因遺伝子の検索結果から、本疾患の第 6 番染色体 6p21.3 内の HLA-B51-MICA009 が最も疾患発症における危険因子であることが

解った。しかし、本疾患の発症が、この2つの遺伝子を持たなくても起きることから、さらに強い相関を示す疾患原因遺伝子があるか全染色体を考慮に入れたゲノムワイドな検討が必要である。

E. 研究発表

論文発表

- 1) Tamiya G, Shiina T, Oka A, Tomizawa M, Ota M, Katsuyama Y, Yoshitome M, Makino S, Kimura M, Inoko H. : New polymorphic microsatellite markers in the human MHC class I region. *Tissue Antigens*, 54:221-228,1999.
- 2) Yabuki K, Ohno S, Mizuki N, Ando H, Tabbara KF, Goto K, Nomura E, Nakamura S, Ito N, Ota M, Katsuyama Y, Inoko H: HLA class I and II typing of the patients with Behcet's disease in Saudi Arabia. *Tissue Antigens*. 54:273-277, 1999.
- 3) Yabuki K, Ota M, Goto K, Kimura T, Nomura E, Ohno S, Mizuki N, Katsuyama Y, Makysymowych WP, Bahram S, Kimura M, Inoko: Triplet repeat polymorphism in the MICA gene in HLA-B27 positive and negative Caucasian patients with ankylosing spondylitis. *Human Immunology*, 60:83-86, 1999
- 4) Ota M, Mizuki N, Katsuyama Y, Tamiya G, Shiina T, Oka A, Ando H, Kimura M, Goto K, Ohno S, Inoko H. : The creitical region for Behcet dsiseae in the huma major histocomaptibble complex is reduced to a 46-kb segement centromeric of HLA-B, by association analysis using refined microsatellite mapping. *Am J Hum Genet*, 64:1406-1410, 1999
- 5) Mizuki N, Ota M, Katsuyama Y, Yabuki K, Ando H, Goto K, Nakamura S, Bahram S, Ohno S, Inoko H.: Association analysis between the MIC-A and HLA-B alleles in Japanese patients with Behcet's disease. *Arthritis Rheumatology*, 42:1961-1966,1999
- 6) Wallace GR, Verity DV, Delamanie LJ, Ohno S, Inoko H, Ota M, Mizuki N, Yabuki K, Kondiatis E, Stephens HAF, Madanat W, Kanawati CA, Stanford MR, Vaughan RW. : MIC-A allele profiles and HLA class I associations in Behcet's disease. *Immunogenetics*. 49:613-617,1999
- 7) Katsuyama Y, Ota M, Ando H, Saito S, Mizuki N, Kera J, Bahram S, Nose Y, Inoko H: Sequencing based typing for genetic polymorphisms in exons 2,3 and 4 of the MICA gene. *Tissue Antigens*, 54:1178-1184,1999
- 8) Yabuki K, Mizuki N, Ota M,

Katsuyama Y, Palimeris G, Stravopoulos C, Koumantaki Y, Spyropoulou M, Giziaki E, Kaklamani V, Kaklamani E, Inoko H, Ohno S: Association of MICA gene and HLA-B*5101 with Behcet's disease in Greece. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 40:1921-1926,1999

- 9) Kera J, Mizuki N, Ota M, Katsuyama Y, Pivetti-Pezzi P, Ohno S, Inoko H.:Significant association of HLA-B*5101 and B*5108, and lack of association of class II alleles with Behcet's disease in Italian patients. *Tissue Antigens*, 54:565-571, 1999

Table 1. Significant linkage disequilibria between the polymorphisms of 5' flanking region of the TNF- α gene and HLA-A,-B, and -DRB1 alleles

Polymorphism of 5'-flanking region of TNF- α				HLA-A	HLA-B	HLA-DR
-1031	-863	-857	-308	-238		
T	C	C	G	G	A	DRB1*0101, DRB1*1502
C	A	C	G	G	B	DRB1*0901
C	C	C	G	A	C	
T	C	T	G	G	D	DRB1*0405
T	C	C	A	G	E	DRB1*0301, DRB1*1301, DRB1*1302

Table 2. Allele frequencies of the 5'-flanking region of the TNF- α gene in BD patients and control groups

	Patient n=83		Control n=210		R.R.	χ^2	P	Pc
	Positive(%)	Negative	Positive(%)	Negative				
A	58 (69.9%)	25	189 (90.0%)	21	0.26	18.20	0.000020	0.00010
B	37 (44.6%)	46	60 (28.6%)	150	2.01	6.88	0.0087	0.044
C	5 (6.0%)	78	7 (3.8%)	3	1.86	1.10	0.30	1.48
D	29 (34.9%)	54	64 (30.5%)	146	1.23	0.55	0.46	2.30
E	0 (0.0%)	83	3 (1.4%)	207	0.36	1.20	0.27	1.37

Table 3. Phenotype frequencies of TNFa microsatellite alleles in BD patients and control groups

allele	patient		Control		R.R.	χ^2	P	Pc
	positive (%)	negative	positive (%)	negative				
95	5	68	11	237	1.58	0.69	4.05E-01	4.86E+00
97	28	45	65	183	1.75	4.04	4.43E-02	5.32E-01
101	4	69	2	246	7.13	6.71	9.56E-03	1.15E-01
103	9	64	8	240	4.22	9.32	2.27E-03	2.72E-02
105	25	48	145	103	0.37	13.28	2.68E-04	3.22E-03
107	2	71	7	241	0.97	0.00	9.70E-01	1.16E+01
111	10	63	5	243	7.71	17.28	3.23E-05	3.87E-04
113	23	50	42	206	2.26	7.42	6.47E-03	7.76E-02
115	7	66	73	175	0.25	11.87	5.70E-04	6.84E-03
117	0	73	2	246	0.67	0.59	4.41E-01	5.30E+00
119	20	53	80	168	0.79	0.62	4.31E-01	5.17E+00
121	1	72	1	247	3.43	0.85	3.56E-01	4.27E+00

Table 4. Phenotype frequencies of TNFd microsatellite alleles in BD patients and control groups

allele	patient		Control		R.R.	χ^2	P	Pc
	positive	(%) negative	positive	(%) negative				
126	0	0.00	3	1.21	0.48	0.89	0.345	2.416
128	0	0.00	5	2.02	0.30	1.50	0.221	1.550
130	48	65.75	149	60.08	1.28	0.77	0.382	2.671
132	28	38.36	72	29.03	1.52	2.29	0.131	0.914
134	38	52.05	161	64.92	0.59	3.96	0.047	0.326
136	0	0.00	4	1.61	0.37	1.19	0.275	1.924
138	6	8.22	27	10.89	0.73	0.44	0.509	3.566

Table 5. Phenotype frequencies of D6S273 microsatellite alleles in BD patients and control groups

allele	Patient		Control		R.R.	χ^2	P	Pc		
	positive (%)	negative	positive (%)	negative						
116	0	0.00	71	2	0.81	246	0.69	0.58	0.448	3.135
126	15	21.13	56	37	35.89	211	1.53	1.56	0.212	1.483
128	2	2.82	69	2	32.66	246	3.57	1.80	0.179	1.256
130	28	39.44	43	89	46.37	159	1.16	0.30	0.584	4.090
132	31	43.66	40	81	42.74	167	1.60	2.93	0.087	0.608
134	33	46.48	38	115	0.00	133	1.00	0.00	0.987	6.910
136	21	29.58	50	106	0.00	142	0.56	3.99	0.046	0.320
138	0	0.00	71	0	0.00	248	3.48	-	-	-

Table 6. Phenotype frequencies of TAP1 microsatellite alleles in BD patients and control groups

allele	Patient		Control		R.R.	χ^2	P	Pc		
	positive (%)	negative	positive (%)	negative						
190	53	72.60	20	181	72.98	67	0.98	0.004	0.949	5.692
192	39	53.42	34	141	56.85	107	0.87	0.269	0.604	3.622
200	17	23.29	56	55	22.18	193	1.07	0.040	0.842	5.049
202	3	4.11	70	13	5.24	235	0.77	0.153	0.696	4.176
204	0	0.00	73	2	0.81	246	0.67	0.592	0.441	2.649
206	0	0.00	73	1	0.40	247	1.12	0.295	0.587	3.521

Table 7. Association of HLA-B51 with BD patients after stratification for the effect of TNF α B allele

allele B	B51		B51		Weighted OR	χ^2	P	95%CI
	negativity		positivity					
	Controls	Patients	Controls	Patients				
Present	50	11	10	26	9.61	58.18	2.40×10^{-14}	5.22 < OR < 17.71
Absent	135	24	15	22				

OR: odds ratio, 95%CI: 95% confidence interval

Table 8. Association of TNF α B allele with BD patients after stratification for the effect of HLA-B51

HLA-B51	allele B negativity		allele B positivity		Weighted OR	χ^2	P	95%CI
	Controls	Patients	Controls	Patients				
Present	15	22	10	26	1.43	0.97	0.33	0.78<OR<2.62
Absent	135	24	50	11				

OR: odds ratio, 95%CI: 95% confidence interval

ベーチェット病関連遺伝子導入マウスの開発

分担研究者	木村 穰	(東海大医分子生命2 教授)
	末水洋志	(東海大医分子生命2)
	佐藤正宏	(東海大総医研)
	渡辺敏輝	(東海大総医研)
	長嶋綾子	(東海大総医研)
	安岡有紀子	(東海大総医研)
	山下俊治	(東海大医分子生命2)
	野村英一	(横浜市大医, 眼科)
	木村孝博	(横浜市大医, 眼科)
	矢吹和朗	(横浜市大医, 眼科)
	大野重昭	(横浜市大医, 眼科 教授)

研究要旨 [目的] ベーチェット病責任遺伝子の候補と考えられた *MICA*、*MICB*、*HLA-B* 遺伝子を導入したトランスジェニックマウス(Tg)を作成し、発症機構の解明を目的とした。[方法] ヒト *MICA*、*MICB* cDNA を強力に全身の細胞での発現を促すプロモーター系の下流に連結させたミニ遺伝子 CAG-*MICA*、CAG-*MICB* を作成後、顕微受精し Tg を作製した。一方で *HLA-B51* Tg とヒト $\beta 2$ ミクログロブリン Tg の交配により両遺伝子を持つ Tg を作製した。また *MICA* の上皮細胞での局在に *MICA* の TM 領域が関係するのではないかと考え、pCMV-*MICA*-GFP、pCMV-*MICA* del-GFP (*MICA* の C 末端の膜貫通 (TM) 領域を含む 48 アミノ酸を削除したもの)、p*MICA* 5.1* (*MICA* の一つのアレルで TM 領域でタンパク質合成が停止するもの) を作成し、培養下で極性を持った細胞の配列をする Madin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞に導入し Green fluorescent protein (GFP) の蛍光もしくは抗 *MICA* 抗体を目印に *MICA* の細胞内発現部位の差を検討した。[結果] *MICA* mRNA の発現を RT-PCR 法で認める系統を 3 系統得た。*MICA* Tg では貧血、両眼性の脈絡膜萎縮、血管の白線化が 3 系統にみられた。また *MICB* Tg については、mRNA の発現を認める系統を少なくとも 1 系統確立している。*MICB* Tg では、生後 1-2 週の皮膚の角化がみられた。また体重減少や末梢血中の白血球数増加がみられた。*HLA-B51* 遺伝子単独の Tg の新しい性質として、網脈絡膜萎縮がみられた。極性を持った状態で培養できる MDCK 細胞では、pCMV-*MICA*-GFP を導入した場合は basolateral な部分に、TM 部分を欠落させた pCMV-*MICA*-del-GFP を導入すると Apical な部分に GFP の蛍光を観察した。ヒトの大腸の上皮でも basolateral な部分に発現がみられることが確認された。[考察] *MICA*、*HLA-B51* 遺伝子もしくはその産物が、マウスの網脈絡膜を障害し発症・進行に関わる可能性が示唆された。*MICA* の TM 以降の部分は上皮系細胞における *MICA* の発現部位を変化させることがわかった。

A. 研究目的

ベーチェット病は従来より *HLA-B51* 抗原との相関が知られており、*HLA-B51* 遺伝子あるいはその近傍に位置するある特定の遺伝的背景のもとに本病が発症すると考えられる。近傍の候補遺伝子として *MICA* (MHC class I chain-related gene A) 遺伝子、*MICB* (MHC class I chain-related gene B) 遺伝子の存在位置が特定され (Bahram *et al.*, 1996a; 1996b, Mizuki *et al.*, 1997), 両者は、共通の祖先遺伝子から発したと考えられている。

MICA は、その mRNA サイズが約 1.4 kb で、

43 kDa の分子をコードし、その中には膜貫通領域や $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 等の様々なドメインを有し、*HLA* クラス I 抗原とのアミノ酸の相同性は低い。タンパク質の三次元構造は *HLA* クラス I 抗原と酷似する。その分子にはペプチド結合部位、T 細胞認識部位があると想像される (Bahram *et al.*, 1994)。また、膜貫通領域にも遺伝的多型を示す部位が存在し、*MICA* 遺伝子の特定のアレルがベーチェット病発症と密接な関係があるのではないかと推察されている (Mizuki *et al.*, 1997)。一方 *MICB* はその mRNA サイズが約 2.4 kb であるが、383 個のアミノ酸

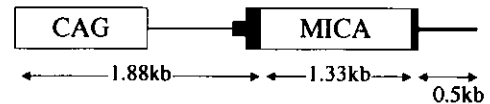
をコードし、MICA との相同性は高い（83%）。MICA mRNA と MICB mRNA の長さの違いは、MICB の 3' 非翻訳領域が MICA のそれよりも大きいことによる (Bahram, S. and Spies, T., 1996)。我々は MICA あるいは MICB の発現異常がベーチェット病発症に関係すると考え、transgenic (Tg) マウス作製手法を用い、マウス組織内に MICA あるいは MICB タンパク質を構成的に過剰発現させる系を考えた。我々は、ヒト MICA cDNA (1.3 kb) 及びヒト MICB cDNA (2.4 kb) を Dr. Bahram (ストラスブル、フランス) から入手し、これらを構成的に発現させるために cytomegalovirus enhancer/chicken β -actin promoter 系 (CAG と称する) の下流 (Miyazaki et al, 1989) に連結した遺伝子構築体を作成した。これら遺伝子構築体 (それぞれ、CAG-MICA 及び CAG-MICB と称する) をマウス受精卵に導入することにより、MICA Tg マウス及び MICB Tg マウスを作製し、これらマウスにおいて MICA 及び MICB 遺伝子が生体内でどのような機能を発現するのかを探ることを目的とした。

また MICA は生体内では小腸上皮に発現していることが知られている。(Bahram, S. and Spies, T., 1996)。しかしその細胞内での正確な発現部位については議論があった。そこで今回は抗ヒト MICA 抗体を用いてヒト発現部位を検討した。また MICA の上皮細胞での局在に MICA の TM 領域が関係するのではないかと考え、培養条件下で極性を持っている MDCK 細胞に pCMV-MICA-GFP, pCMV-MICA del-GFP (MICA の C 末端の TM 領域を含む 48 アミノ酸を削除したもの)、pCAG-MICA 5.1* (MICA の一つのアレルで TM 領域にタンパク質合成のストップコドンがあるもの) を作成し、GFP の蛍光または抗 MICA 抗体を目印に用いて MICA の発現部位に差がないか検討することを目的とした。

B. 研究方法

ヒト MICA cDNA 及びヒト MICB cDNA を Dr. Bahram (ストラスブル、フランス) から入手し、これらを構成的に発現する CAG promoter 系の下流に連結した遺伝子構築体 (CAG-MICA 及び CAG-MICB) を作成し (図 1)、これらをマウ

・ pCAGGS-MICA



・ pCAGGS-MICB

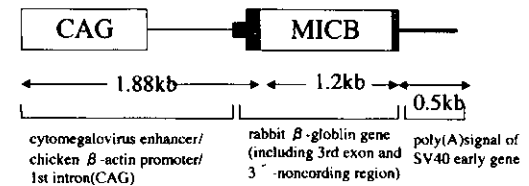


図 1. CAG-MICA, CAG-MICB の構造

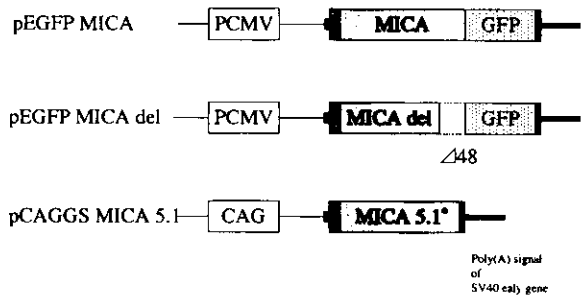


図 2. pEGFP MICA, pEGFP MICA del, pCAGGS MICA 5.1* の構造

ス受精卵への導入遺伝子として用いた。

マウス受精卵への遺伝子導入法は、定法である顕微注入法を用いた。得られたマウスが外来性遺伝子を有しているかどうかの判定は、尾 DNA の genomic Southern 法及び PCR-Southern 法で決定した。組織における外来性遺伝子の発現の有無は、RT-PCR 法、及び Northern 法にて決定した。この解析から、発現の高いマウス系統を選別する。この系統の維持を図ると同時に、表現型の変化の観察 (特に体重の推移、血液内細胞成分の変化、皮膚の変化、外性器の変化、眼の変化及び炎症の発症等を中心に) を行った。

眼底変化を詳細に観察するため、フルオロセインナトリウムによる蛍光眼底造影撮影を行った。フルオロセインナトリウムを 20 μ l/匹を腹腔内投与し、手持ち眼底カメラで経時的に撮影した。HLA-B51 Tg に関しても同様の眼底観察、蛍光眼底造影撮影をおこなった。

抗 MICA 抗体を得るため、ヒト MICA cDNA を組み込んだ発現ベクター (pCAGGS-MICA) をマウスミエローマ (NS1) 細胞にリポフェクション法で遺伝子導入し、ネオマイシン耐性細胞をクローン化した。得られた細胞を 4% パラフォルムアルデヒドで固定しマウスに免疫した。抗体価の上昇を Immunoblot 法で確認した。

