

図2 発病年齢構成分布の年推移：女性

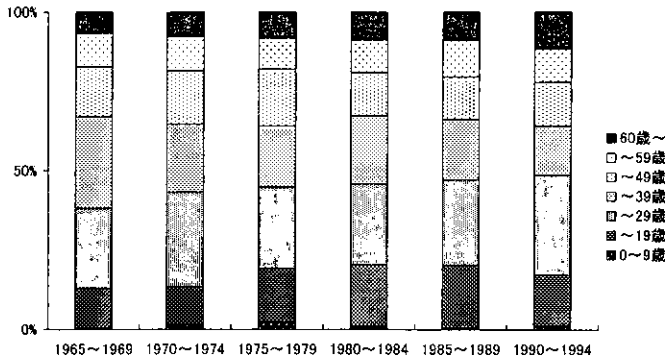


図3 10万人当たり発病よりみた発病年齢構成分布の年推移：男性

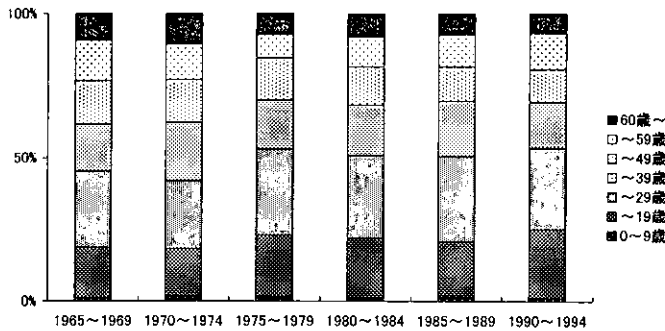
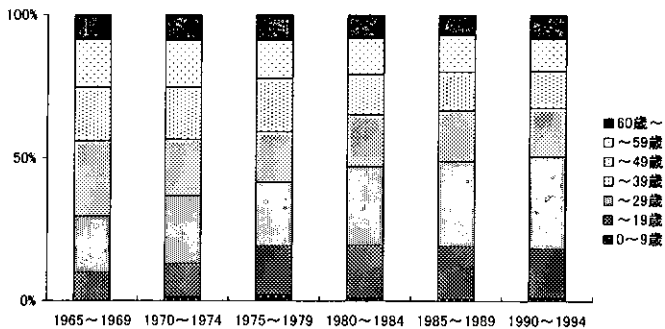


図4 10万人当たり発病よりみた発病年齢構成分布の年推移：女性



2. 世代を考慮した検討

ここでは世代を生年に置き換えて、生年別・発病年齢別の発病率を求めてみた。

表1は、

生年：1910～1914, 1915～1919, …, 1990～1994年  
 発病年齢：0～4, 5～9, 10～14, …, 65～69歳

の17×14の組み合わせに対する発病率(10万人当たりの発病数)を示したものである(表1)。

データは斜め方向に存在し、どの世代にも分布の山が存在する。これはおそらくこの種の調査データの収集状況によると思われる。すなわち、調査で収集されたデータの発病時期をみると、調査時点の約4年前までの発病例が約7割、5～10年の経過例が約2割、10年以上も経過した例が約1割である。ある時点の発病例の7割が把握されるのに、4.5年の調査期間を要し、9割把握するのに約10年かかるということである。したがって、調査開始から約25年(実質の調査は約20年)を経過した

現在でも、より新しい発病例や、古い世代の若年発病例は仮にあったとしても把握できていない可能性が高い。このようなことから表1のデータは斜め方向にしか存在していない。例えば1960年生まれが1985年に25歳で発病したとすると、1993年までの調査では登録されていないこともありうる。調査を今後も繰り返せば少しずつ把握できるとはいえ、現時点ではこの領域を完全には把握できているといえない。そういう意味で生年別発病年齢別の発病率を評価するにはなおデータが不足ではあるが、発病率が上位約1割に当たる0.6人を超える箇所を表1のごとく開いてみると、発病率の高いセルが固まったブロックに集中しているという傾向がみられる。生年が1975年以降では15歳発病でも1990年以降の発病になるため、1993年の最終新患調査では把握が不十分である。この領域は今後の発病率はさらに高くなると考えられ、それを考慮すると、発病率の高いのは戦後生まれに当たるブロックに相当することとなる。

表1 生年別・発病年齢別発病率(10万人当たり)

生年	発病年齢													
	～4	～9	～14	～19	～24	～29	～34	～39	～44	～49	～54	～59	～64	～69
1910～														
1915～								0.02	0.04	0.10	0.30	0.43	0.35	0.28
1920～								0.06	0.12	0.24	0.35	0.36	0.35	0.19
1925～						0.03	0.04	0.13	0.30	0.51	0.35	0.37	0.18	0.04
1930～					0.03	0.04	0.11	0.31	0.47	0.43	0.36	0.19	0.04	
1935～				0.02	0.03	0.08	0.31	0.50	0.52	0.38	0.19	0.02		
1940～			0	0.02	0.12	0.43	0.63	0.47	0.37	0.20	0.04			
1945～		0	0.02	0.09	0.46	0.71	0.61	0.52	0.22	0.03				
1950～	0	0	0.04	0.26	0.67	0.64	0.53	0.27	0.03					
1955～	0	0	0.13	0.63	0.90	0.70	0.33	0.03						
1960～	0	0.03	0.32	0.86	0.95	0.49	0.04							
1965～	0.02	0.07	0.42	0.79	0.55	0.08								
1970～	0.03	0.08	0.4	0.38	0.08									
1975～	0.02	0.05	0.17	0.07										
1980～	0.01	0.02	0.04											
1985～	0.01	0												
1990～	0													

3. 世代による全大腸炎型の発病傾向の検討

さらに、初発時の罹患範囲別病型と世代による推移による検討を試みた。ここでは発病時に報告された罹患部位から全大腸炎型を抽出した。表2は、

生年：1910～1914, 1915～1919, …, 1980～1984年

発病年齢：0～4, 5～9, 10～14, …, 65～69歳

の15×14の組み合わせに対する全大腸炎型の発病率(10万人当たりの発病数)を示したものである(表2)。

斜め方向にしかデータがないことは前述したのと同様である。この表についても、比較的全大腸炎型の多いブロックを開いてみたが、ここでも世代と関係がありそうである。

表2 生年別・発病年齢別全結腸炎型発病率(10万人当たり)

生年	発病年齢区分													
	～4	～9	～14	～19	～24	～29	～34	～39	～44	～49	～54	～59	～64	～69
1910～														
1915～										0.03	0.05	0.08	0.04	
1920～										0.09	0.10	0.09	0.06	
1925～										0.05	0.05	0.07	0.08	0.11
1930～								0.04	0.06	0.11	0.10	0.11	0.07	0.02
1935～						0.03	0.10	0.11	0.13	0.10	0.07	0.01		
1940～					0.06	0.13	0.14	0.11	0.09	0.06	0.02			
1945～				0.05	0.15	0.17	0.16	0.14	0.07	0.02				
1950～			0.02	0.09	0.24	0.2	0.14	0.08	0.01					
1955～		0	0.06	0.24	0.33	0.25	0.08	0						
1960～	0	0.01	0.15	0.39	0.37	0.19	0.01							
1965～	0.01	0.03	0.23	0.38	0.21	0.01								
1970～	0.01	0.04	0.2	0.18	0.03									
1975～	0.01	0.03	0.09	0.03										
1980～	0	0.01	0.02											

次に全大腸炎型が占める割合を生年ごとに求めてみたのが表3であり、また、表3の最右欄の全大腸炎型の割合を図示したのが図5である。

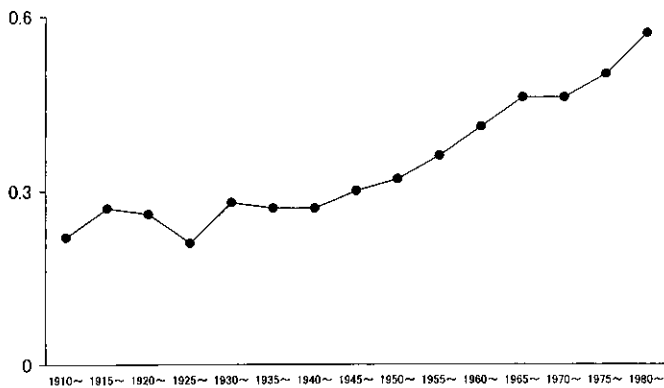
全大腸炎型の割合は1944年生まれ以前は横這いで

あったのに対し、その後の世代では増加の一途で、1975年以降では5割を越す勢いである。この世代では発病数自体は十分把握できていないが、全大腸炎型の占める割合は母集団の推定に近いと思われる。このような高い比率は潰瘍性大腸炎発病の因子が世代とともに変わってきたことを暗示しているのではないだろうか(表3)(図5)。

表3 生年別発病状況

生年	生年別発病数		生年別発病率		全大腸炎型の割合(%)
	全体	全大腸炎型	全体	全大腸炎型	
1910~	205	46	0.95	0.21	0.22
1915~	331	88	1.44	0.39	0.27
1920~	421	106	1.62	0.42	0.26
1925~	637	149	2.15	0.46	0.21
1930~	761	211	1.98	0.55	0.28
1935~	841	228	2.04	0.56	0.27
1940~	1002	272	2.27	0.62	0.27
1945~	1256	369	2.55	0.77	0.3
1950~	1252	399	2.43	0.78	0.32
1955~	1127	402	2.71	0.97	0.36
1960~	1063	442	2.70	1.12	0.41
1965~	810	371	1.93	0.88	0.46
1970~	468	216	0.97	0.45	0.46
1975~	144	70	0.30	0.15	0.50
1980~	30	15	0.07	0.04	0.57

図5 罹患範囲別病型に占める全大腸型の占める割合



#### D. 考察

潰瘍性大腸炎の発病要因を探るために、従来は、発病年齢の傾向を検討してきた。そこでは発病年齢が若年層にシフトしてきたという結論が得られたが、本当に発病年齢が若年層にシフトしているのか、若い世代の発病が増加してきているのかさらに確かめる必要性があった。今回の検討は、それに一つの回答を得るために行ったものである。その結果、発病年齢構成の分析では、わが国の潰瘍性大腸炎の発病様式は発病率の増加とともに若年化の傾向を示したが、近年、その傾向は止まったことが示されるとともに、世代による検討で潰瘍性大腸炎の発病率が戦後生まれの世代で多くなっているという見方が導かれ、世代の要因がより大きな因子であることが推定された。1975年以降の世代では全大腸炎型の割合が5割を越えているが、このようなことは、調査を開始した25年前には想像もできなかったことであり、発病要因を考える上で重要な最近の知見であると思われる。すなわち、患者個人の現代的ストレスや食生活の欧米化というこれまで指摘してきた要因だけでなく、大腸自体に何らかの易罹患性をもって生まれてきたのではないかと思われる世代が生じつつあるという現象が想定されるのである。それは母親の生活環境の変化が、次世代への影響として現れたのであるかどうかは不明といわざるを得ないが、今後、関心を払わずにはいられないという点ではないだろうか。

厚生科学研究費補助金特定疾患対策研究事業  
「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究」班  
分担研究報告書

沖縄県における炎症性腸疾患の疫学調査

分担研究者 金城 福則 琉球大学医学部 第一内科 助教授

研究要旨：炎症性腸疾患の潰瘍性大腸炎（UC）および Crohn 病（CD）は、わが国においては医療費給付の対象となる特定疾患として扱われ、年々増加し、1997年度にはUCが51,477人、CDが15,440人となった。わが国における炎症性腸疾患の全国的疫学調査は、患者のプライバシー保護の面から、十分な検討がなされていないのが現状である。これまでのわれわれの調査結果によると、過去約18年間で沖縄県内の医療施設で診断治療された UC 患者は 765 人、CD 患者は 330 人である。1990 年以降の特定疾患医療費受給者の調査からみても、UC 患者が 635 人、CD 患者が 291 人となっている。しかし、1999 年度の特定疾患医療費受給者数は UC が 449 人（更新者 371 人、新規者 78 人）、CD が 174 人（更新者 174 人、新規者 23 人）であり、前年度受給者の未更新者が UC で 63 人（14.5%）、CD で 16 人（8.4%）いた。今後の詳細な調査により、診断基準の見直しや難治性要因の解明に役立てたい。

共同研究者

砂川 隆、久貝 雪野、諸喜田 林、外間 昭、  
半仁田慎一、又吉 亮二、内間 庸文、  
豊見山良作、斎藤 厚

所属 琉球大学医学部 第一内科

者個人のプライバシーの保護に十分な配慮を行いながら情報収集を行っている<sup>4)</sup>。また、消化器疾患診療に携わっている沖縄消化器内視鏡会会員およびその所属施設に対しても、1985年10月と1988年9月に炎症性腸疾患診療実態調査のためのアンケート調査を実施している<sup>4)</sup>。その後も自験例を中心に患者登録を継続しているが、今回は、1999年度の特定疾患医療費受給者の臨床調査個人票の資料を加えて検討した。

A. 研究目的

沖縄県においては、1973年度以降、国の「難病対策要項」に基づき「沖縄県特定疾患治療研究事業実施要項」が策定されており、それに基づいて現在44疾患の患者の医療費のうち保険診療の自己負担分を公費で負担することにより、治療研究の推進と患者の医療費の負担軽減を図っている。また、この度、国は公衆衛生審議会難病対策専門委員会の提言を経て、難病対策の大幅な見直しを行い、重症患者対策のため、1998年5月1日より、重症患者については全額公費負担を、重症以外については一部負担を導入することとなった。特定疾患医療費受給者数は年々増加傾向にあり、1997年度には潰瘍性大腸炎（UC）が51,477人、Crohn病（CD）が15,440人となった。本難治性炎症性腸管障害調査研究班においては両疾患の診断基準の検討が継続的に行われており<sup>1,2)</sup>、疾患の重症度とは別の観点から重症度認定の基準の策定も必要となった<sup>3)</sup>。

以上の情勢のもとに、今回は沖縄県におけるUC、CDの医療費受給者の状況を把握することを目的とした検討を行った。

B. 研究方法

われわれは1985年10月、1988年9月、1992年2月および1995年7月に特定疾患患者の届け出状況から患

C. 研究結果

1981年以降に沖縄県内の医療施設で診断治療されたUC患者は765人、CD患者は330人である。1990年以降の特定疾患医療費受給者数は年々増加し、1999年度はUC患者が449人、CD患者が197人となっている（略・表1）。しかし、その間に受給者として一度は登録されているものは、UCで635人、CDで291人いる（略・表2,3）。すなわち、県外への移住者や死亡者を除外する必要があるが、UCで70.7%、CDで67.9%の症例が継続更新していないことになる。継続更新していない症例の多くは、緩解状態を維持しており、医療費の給付を必要としない状況にあるものと推測されるが、両疾患が難治性であることより、診断または、特定疾患としての認定そのものに問題が存在していたことも否定はできない。

1999年度の沖縄県における特定疾患医療費受給者のUC患者は449人であり、そのうち更新者が371人、新規者78人である。しかし、1998年度の受給者は434人であり、未更新者が63人14.5%もいた。Crohn病においては、1999年度受給者197人のうち更新者174人、新規者23人であった。また、1998年度受給者190人中16人（8.4%）が未更新者であった。

1998年5月以降の特定疾患の患者においては、医療費の全額が公費負担となる重症認定を行うことができる

が、1998年度に沖縄県において重症認定されたUC患者は5人(1.15%)、Crohn病5人(2.63%)であった。全額公費負担となる重症認定は、当然のことながら、両疾患の疾病の重症度分類そのものではない。

#### D. 考 察

沖縄県における炎症性疾患の今後の詳細な疫学調査は、診断基準の見直しや難治性要因の解明に役立つことが期待できる。

#### E. 参考文献

- 1) 棟方 昭博：潰瘍性大腸炎診断基準改訂案 厚生省特定疾患難治性炎症性調査研究班，平成9年度研究報告書 1998:p96-99.
- 2) 八尾 恒良：クローン病診断基準(改訂案) 厚生省特定疾患難治性炎症性調査研究班，平成6年度研究報告書 1995:p63-66.
- 3) 下山 孝：重症度認定基準(案) 厚生省特定疾患難治性炎症性調査研究班，平成10年度研究報告書 1999:209
- 4) 金城 福則，大城 淳一，斎藤 厚：沖縄における炎症性腸疾患 沖縄の疾病とその特性，九州大学出版会 1996:p89-100.

厚生科学研究費補助金特定疾患対策研究事業  
 「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究」班  
 分担研究報告書

炎症性腸疾患の TNF- $\alpha$ , TNFR1, TNFR 2 遺伝子多型との相関

分担研究者 田村 和朗 兵庫医科大学 先端医学研究所家族性腫瘍部門 助教授

研究要旨：[目的] 炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎，クローン病）発症の遺伝的背景にサイトカイン遺伝子の遺伝子型との相関が指摘されてきた。今回，tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) 遺伝子，tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1) 遺伝子，tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) 遺伝子を疾患候補遺伝子として取り上げ，発症や病態との関連性を検討した。[対象と方法] クローン病 (CD) 119 例，潰瘍性大腸炎 (UC) 64 例を対象とした。健康成人 73 名を対照群 (DFC) とし，遺伝的多型性を用いて比較検討した。末梢血から単球由来の DNA を抽出し，遺伝子多型解析に用いた。TNF- $\alpha$  遺伝子は 5'-非翻訳領域の -308 および -238 の多型を，TNFR1 はコドン 12 の多型，TNFR2 は 3'-非翻訳領域の 2 箇所の多型を DNA シークエンス法で解析した。統計解析は  $\chi^2$  法，Mantel-Haenszel 法を用いた。[結果] TNF- $\alpha$  遺伝子のアレル 3 (-308A, -238G) は UC と有意な相関が認められた ( $P=0.00532757$ )。特に -308 A アレルが UC との相関に寄与しており ( $P=0.00282677$ )，OR (95% CI) は 5.28 (1.65-16.88) であった。TNFR1 においては各群間に明かな相関は認められなかった。TNFR2 遺伝子のアレル 2 (1466A, 1493T) 保有者が CD と有意な相関が認められた ( $P=0.02098313$ )。OR (95% CI) は 2.77 (1.14-6.73) であった。瘻孔形成を伴う CD 患者で有意差がさらに顕著に認められた (アレル頻度： $P=0.00607737$ ，アレル 2 保有者頻度： $P=0.00087533$ ，OR 5.39, 95% CI 1.88-15.45)。TNFR1 遺伝子でアミノ酸配列に変化をもたらす遺伝子変異は認められなかった。[考案・結論] TNF- $\alpha$  遺伝子，TNFR2 遺伝子の多型解析から，それぞれ UC，CD の発症や病態に関わる遺伝的背景の存在が示唆された。しかし，アミノ酸配列に変化をもたらす遺伝子変異は認められておらず，今後これらの遺伝子の調節領域や近傍の遺伝子さらには遺伝子産物と会合する蛋白の遺伝子群の検討が必要と考える。

共同研究者  
 指尾 宏子，古山 順一  
 所属 兵庫医科大学 遺伝学

A. 研究目的

潰瘍性大腸炎 (UC) あるいはクローン病 (CD) は炎症性腸疾患 (IBD) と称される原因不明の疾患である。原因のひとつとして遺伝的背景が考えられており，家族内発症例を中心に連鎖解析を用いた検討が行われてきた<sup>1-4)</sup>。また，炎症に関連する主要組織適合抗原 (HLA) やサイトカインなどをコードする遺伝子を候補遺伝子と考え，これらの遺伝子の多型性解析からのアプローチも進められてきた<sup>5-9)</sup>。われわれは潰瘍性大腸炎患者，クローン病の遺伝的背景を探るため，関連すると推測されるサイトカインおよびその受容体をコードしている遺伝子の多型解析による case・control study を行った。さらに，これら遺伝子の翻訳領域の DNA 塩基配列解析を行うことで原因となる遺伝子を見いだすことも目的とした。

B. 研究方法

潰瘍性大腸炎患者，クローン病患者の病態，家族集積性，家族構成員の情報収集を行うとともにインフォームドコンセントを得た上で末梢血の採取を行った。得られた末梢血は DNA 抽出，RNA 抽出を行い，さらに可能な限り EB ウィルスを用いたリンパ芽球様細胞株 (lymphoblastoid cell line: LCL) 樹立を行った。クローン病患者 119 例，潰瘍性大腸炎患者 64 例からサンプルを得た。健康成人 73 名を対照群 (DFC) とし，同様に核酸サンプルを抽出し，遺伝的多型性解析に供した。遺伝子多型解析は炎症に強く関係するサイトカインの一つである tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 遺伝子 (MIM 191160, 6p21.3) とその受容体をコードする tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1) 遺伝子 (MIM 191190, 12p13.2) および tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) 遺伝子 (MIM 191191, 1p36.3-p36.2) を候補として多型性解析を single nucleotide polymorphism (SNP) を用いて行った。SNP 解析は DNA シークエンス法による。対立遺伝子およびハプロタイプの頻度を基に  $\chi^2$  法，Mantel-Haenszel 法で統計的解析を行った。TNF- $\alpha$  遺伝子は 5' プロモーター領域に存在する -308 G/A, -238 G/A の多型を用いた。TNFR1 遺伝子は exon 1 の codon 12 の CCA/CCG 多型を用いた。TNFR2 遺伝子は 3' 非翻訳領

域の2ヶ所のSNP, 1466 A/G, 1493 C/T多型を用いた, TNFR2 遺伝子に関しては全翻訳領域の DNA シークエンス解析を行い, 遺伝子変異検出の同定を試みた.

### C. 研究結果

#### 1. TNF- $\alpha$ 遺伝子多型との相関

TNF- $\alpha$  遺伝子の 5' プロモーター領域の -308, -238 の SNP 解析からハプロタイプによる 4 種類のアレルに分類される (表-1). 群間の頻度の差を統計的に解析すると UC 群は対照群との間に有意差が存在する ( $P=0.0182877$ ). アレル3 (-308A, -238G) 保有者頻度は UC と有意な相関が認められた ( $P=0.00532757$ ). この要因には -308A アレルが UC 群に高率でこの相関に寄与していた ( $P=0.00282677$ ). Odds ratio (OR) は 5.28 で, 95% Confidence Interval (CI) は 1.65-16.88 であった (表-2). -308 における遺伝子型においても UC 群は対照群と有意差が認められた ( $P=0.00282677$ ). 一方, CD 群と対照群は差が認められなかった.

表 1 Allele frequencies and carrier frequencies of 5'-flanking region of the TNF- $\alpha$  gene

Phenotype	Site			n (%)	Frequency of Allele 3 carrier	OR (95% CI)	$P_{\text{corr}}^b$
	-308	-238					
CD (n=119)	1	G	G	225(94.5%)	4.2% (n=5)	0.76 (0.20-2.91)	0.95618194
	2	G	A				
	3	A	G				
	4	A	A				
UC (n=64)	1	G	G	109(85.2%)	23.4% (n=15)	5.28 (1.65-16.88)	0.00532757
	2	G	A				
	3	A	G				
	4	A	A				
DFC (n=73)	1	G	G	141(96.6%)	5.5% (n=4)		
	2	G	A				
	3	A	G				
	4	A	A				

CD: Crohn's disease UC: Ulcerative colitis DFC: Disease free control  
 $P_{\text{corr}}^a$ : William's correction  $P_{\text{corr}}^b$ : Yates's correction  
 OR: Odds ratio 95% CI: 95% confidence interval  
 OR and 95% CI were estimated by the Mantel- Haenszel statistical method.

表 2 TNF- $\alpha$  gene-308G/A allele frequencies and genotype

Phenotype	Allele number (%)		OR (95% CI)	$P_{\text{corr}}^b$	Frequency of Allele 2 carrier	OR (95% CI)	$P_{\text{corr}}^b$
	G	A					
CD (n=119)	232 (97.5%)	6 (2.5%)	0.92 (0.25-3.31)	0.84195057	5 (4.2%)	0.76 (0.20-2.91)	0.68428514
	Genotype						
CD (n=119)	G/G	G/A	A/A	0.57631551			
	114 (95.8%)	4 (3.4%)	1 (0.8%)				
UC (n=64)	111 (86.7%)	17 (13.3%)	5.44 (1.78-16.62)	0.00232685	16 (25.0%)	5.75 (1.81-18.27)	0.00282677
	Genotype						
UC (n=64)	G/G	G/A	A/A	0.0118759			
	48 (75.0%)	15 (23.4%)	1 (1.6%)				
DFC (n=73)	142 (97.3%)	4 (2.7%)			4 (5.5%)		
	Genotype						
DFC (n=73)	G/G	G/A	A/A				
	69 (94.5%)	4 (5.5%)	0 (0%)				

CD: Crohn's disease UC: Ulcerative colitis DFC: Disease free control  
 $P_{\text{corr}}^a$ : William's correction  $P_{\text{corr}}^b$ : Yates's correction  
 OR: Odds ratio 95% CI: 95% confidence interval  
 OR and 95% CI were estimated by the Mantel- Haenszel statistical method.

#### 2. TNFR1 遺伝子多型との相関

TNFR1 遺伝子の codon 12 CCA/CCG 多型において CD 群で CCG アレル頻度が低い傾向にあったが, 有意差は認められなかった ( $P=0.08079015$ ). CD 群のアレル保有者頻度, 遺伝子型分布は対照群とは若干の差がみられたが, 統計的にはそれぞれ  $P=0.06189048$ ,  $P=0.26871606$  で群間に明かな相関は認められなかった (表-3). UC 群と対照群には遺伝子多型の相関は認められなかった.

表 3 Allele frequencies and genotype of codon 12 CCA/CCG polymorphism of the TNFR1 gene

Phenotype	Allele number (%)			OR (95% CI)	$P$	Frequency of A allele carrier	OR (95% CI)	$P$
	CCA	CCG						
CD (n=119)	208 (87.4%)	30 (12.6%)	1.65 (0.94-2.89)	0.0807902	29 (24.4%)	0.55 (0.29-1.03)	0.06189048	
	Genotype							
CD (n=119)	CCA/CCG	CCA/CCG	CCG/CCG	0.26871606				
	90 (75.6%)	28 (23.5%)	1 (0.8%)					
UC (n=64)	102 (79.7%)	26 (20.3%)	0.93 (0.51-1.69)	0.8138079	26 (40.6%)	1.17 (0.59-2.32)	0.66262298	
	Genotype							
UC (n=64)	CCA/CCG	CCA/CCG	CCG/CCG	0.33536847				
	38 (59.4%)	26 (40.6%)	0 (0%)					
DFC (n=73)	118 (80.8%)	28 (19.2%)			27 (37.0%)			
	Genotype							
DFC (n=73)	CCA/CCG	CCA/CCG	CCG/CCG					
	48 (63.0%)	26 (35.6%)	1 (1.3%)					

CD: Crohn's disease UC: Ulcerative colitis DFC: Disease free control  
 $P_{\text{corr}}^a$ : William's correction  
 OR: Odds ratio 95% CI: 95% confidence interval  
 OR and 95% CI were estimated by the Mantel- Haenszel statistical method.

#### 3. TNFR2 遺伝子多型との相関

TNFR2 遺伝子の 3' 非翻訳領域の nt1466, nt1493 の SNP 解析を行うとハプロタイプによる 4 種類のアレルに分類される (表-4). CD 群でアレル2 (1466A, 1493T) 頻度が高い傾向が認められた ( $P=0.14353348$ ). アレル2 保有者頻度が CD 群で有意な相関が認められた ( $P=0.02098313$ ). その OR は 2.77 であり, 95% CI は 1.14-6.73 であった. 特に瘻孔形成を伴う CD 患者群で明かな有意差が認められた (表-5). アレル頻度は 19.6% ( $P=0.00607737$ ), アレル2 保有者頻度は 36.4% ( $P=0.00087533$ , OR 5.39, 95% CI 1.88-15.45) であった. UC 群と TNFR2 遺伝子のアレル頻度に相関は認められなかった.

表 4 Allele frequencies and carrier frequencies of 3'-flanking region of the TNFR2 gene

Phenotype	Site			n (%)	Frequency of Allele 2 carrier	OR (95% CI)	$P$
	1466	1493					
CD (n=119)	1	A	C	97(40.8%)	22.7% (n=27)	2.77 (1.14-6.73)	0.02098313
	2	A	T				
	3	G	C				
	4	G	T				
UC (n=64)	1	A	C	47(36.7%)	15.6% (n=10)	1.75 (0.62-4.89)	0.28499739
	2	A	T				
	3	G	C				
	4	G	T				
DFC (n=73)	1	A	C	63(43.2%)	9.6% (n=7)		
	2	A	T				
	3	G	C				
	4	G	T				

CD: Crohn's disease UC: Ulcerative colitis DFC: Disease free control  
 OR: Odds ratio 95% CI: 95% confidence interval  
 OR and 95% CI were estimated by the Mantel- Haenszel statistical method.

表 5 Allele frequencies and carrier frequencies of 3'-flanking region of the TNFR2 gene

Phenotype	Site			n (%)	Frequency of Allele 2 carrier	OR (95% CI)	$P$
	1466	1493					
CD with fist (n=33)	1	A	C	24(36.4%)	36.4% (n=12)	5.39 (1.88-15.45)	0.00087533
	2	A	T				
	3	G	C				
	4	G	T				
CD fistulae fi (n=86)	1	A	C	73(42.4%)	17.4% (n=15)	1.99 (0.76-5.19)	0.15297497
	2	A	T				
	3	G	C				
	4	G	T				
DFC (n=73)	1	A	C	63(43.2%)	9.6% (n=7)		
	2	A	T				
	3	G	C				
	4	G	T				

CD: Crohn's disease UC: Ulcerative colitis DFC: Disease free control  
 OR: Odds ratio 95% CI: 95% confidence interval  
 OR and 95% CI were estimated by the Mantel- Haenszel statistical method.

#### 4. TNFR1 遺伝子変異解析

TNFR1 遺伝子の全翻訳領域の DNA シークエンス解析を行ったが、アミノ酸配列に変化をきたす遺伝子変異は認めなかった。

#### D. 考案

炎症に関わるサイトカインである TNF- $\alpha$  とその受容体である TNFR1, TNFR2 のそれぞれの遺伝子多型を用いて case・control study を行ったところ次のことが明らかとなった。TNF- $\alpha$  遺伝子の 5'プロモーター領域の -308G/A, -238G/A 多型でアレル 3 (-308A, -238G) は UC 群と相関がみられた。また、-308A とも強い相関が認められた。Plevy らは TNF- $\alpha$  遺伝子の -308G/A 多型で -308A 頻度に差はなく、CD 群で低頻度であると報告している<sup>8)</sup>。Negoro らは 5'プロモーター領域のさらに上流の多型を用い、CD 群との相関を示している<sup>9)</sup>。われわれの集積したデータとこれら過去の報告との相違は症例数の増加と遺伝子産物の機能的解析等で確認していく必要がある。

TNFR2 遺伝子の多型解析からは CD 群との相関が示唆された。アレル 2 (1466A, 1493T) 頻度が CD 群で高率であり、特に瘻孔形成を伴う CD 患者群でより強い相関を示した。

抗 TNF キメラ抗体を用いた治療の奏功と遺伝情報との関連が明らかになれば治療方針の選択を容易にすることが可能となり、QOL を向上に貢献できることも考えられ、臨床経過との検討も必要と考えている。

相関を認められたにもかかわらず TNF- $\alpha$  遺伝子、TNFR2 遺伝子の変異は未だ認められていない。今後は翻訳領域を中心に DNA シークエンス解析を進める必要がある。さらに、アレル毎の発現解析や TNF- $\alpha$ , TNFR2 と会合する分子を解析できるシステムの構築が必要となる。

#### E. 参考文献

- 1) Hugot J-P, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, et al: Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 1996;379:821-823.
- 2) Satsangi J, Parkers M, Louis E, et al: Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosome 3, 7, 12. *Nature Genet* 1996;14:199-202.
- 3) Ohmen JD, Yang H-Y, Yamamoto KK, et al: Susceptibility locus for inflammatory bowel disease on chromosome 16 has a role in Crohn's disease, but not in ulcerative colitis. *Hum Mol Genet* 1996;5:1679-1683.
- 4) Cho JH, Nicolae DL, Gold LH, et al: Identification of novel susceptibility loci for inflammatory bowel disease on chromosomes 1p, 3q, and 4q: Evidence for epistasis between 1p and IBD1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:7502-7507.
- 5) Mansfield JC, Holden H, Tarlow JK, et al: Novel genetic association between ulcerative colitis and the anti-inflammatory cytokine interleukin-1 receptor antagonist. *Gastroenterol* 1994;106:637-642.
- 6) Satsangi J, Welsh KI, Bunce M, et al: Contribution of genes of the major histocompatibility complex to susceptibility and disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Lancet* 1996;347:1212-1217.
- 7) Plevy SE, Targan SR, Yang H, et al: Tumor necrosis factor microsatellites define a Crohn's disease-associated haplotype on chromosome 6. *Gastroenterol* 1996;110:1053-1060.
- 8) Satsangi J, Roussomoustakaki M, Parkers M, et al: Cytokine gene polymorphisms in inflammatory bowel disease. *Gut* 1996;39:705-710.
- 9) Negoro K, Kinouchi Y, Hiwatashi N, et al: Crohn's disease is associated with polymorphism in the 5'-flanking region of the tumor necrosis factor gene. *Gastroenterol* 1999;117:1062-1068.

厚生科学研究費補助金特定疾患対策研究事業  
 「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究」班  
 分担研究報告書

日本人クローン病における, TNF  $\alpha$  遺伝子 5' 側領域の多型

分担研究者 樋渡 信夫 東北大学医学部 第三内科 助教授

研究要旨: [目的] 近年 TNF  $\alpha$  遺伝子 5' 側領域 (TNF  $\alpha$  の転写に影響を与えている可能性が高い) に新たな多型が報告され in vitro で Con-A 刺激 TNF  $\alpha$  産生が増加することが報告された. 活動期クローン病では血清・局所組織・便それぞれの TNF  $\alpha$  が上昇する一方, 抗 TNF  $\alpha$  抗体を投与すると, クローン病の臨床症状・組織活動性が低下改善する. TNF  $\alpha$  遺伝子 5' 側領域の多型と, 炎症性腸疾患とくにクローン病との関係を調べる. [方法] 1998年5月から1999年1月の期間に東北大学医学部附属病院第三内科を受診した日本人患者, クローン病 103 例 (女性 26, 男性 77, 平均年齢 32 歳), 潰瘍性大腸炎 76 例 (女性 31, 男性 45, 平均年齢 38 歳) を対象に, 末梢血単核球より DNA を抽出し, PCR 法にて TNF  $\alpha$  遺伝子 5' 側領域を増幅し, direct sequence 法により, -1031C, -863A, -857T, -308A, -238A の五ヶ所の遺伝子多型を調べた. 575 例の健常者データは樋口らのデータを使用した. [成績] ①クローン病では -1031C, -863A, -857T のアリル頻度が, 健常コントロールに比して, 有意に高かった. 潰瘍性大腸炎では全体にやや低めの傾向を示したが有意ではなかった. ②クローン病をさまざまな臨床型 (病型, 穿孔の有無, 肛門病変の有無, ステロイド治療の有無, 手術の有無) により比較したところ, これら3つの多型は小腸型においてより高い傾向を有することがわかった. ③クローン病において2つの新しい多型 -1196T, -1125C を認めた. [結論] TNF  $\alpha$  遺伝子 5' 側領域多型の高いアリル頻度が単に連鎖によるものなのか, 独立に病因の危険因子となっているかは, さらに検討する必要があるものの, TNF  $\alpha$  がクローン病の感受性遺伝子である可能性が示された. これらの多型とクローン病との関係は, より多くの症例で, また異なる人種でも検討する必要がある.

共同研究者

根来 健一, 木内 喜孝, 高橋 成一

所属 東北大学医学部 第三内科

A. 研究目的

炎症性腸疾患 (クローン病および潰瘍性大腸炎) は原因不明の慢性腸炎であり, その発症には遺伝的因子が関係していることが明らかにされている. とくにクローン病では, 血縁者内の複数発症例 (クローン病の血縁者間での有病率は, 一般のそれと比較して 35.5 倍であり<sup>1)</sup>, これは遺伝的素因が強いと言われているインスリン依存型糖尿病よりも高い値である.) や双生児発症例などの研究により, その病因に遺伝的背景の強く関与していることが指摘されている<sup>2-8)</sup>. またクローン病は多因子遺伝病と考えられ, 既に欧米からは, 感受性遺伝子が存在する染色体座位がいくつか報告されている<sup>9-10)</sup>ものいまだ感受性遺伝子の特定はなされていない. それを明らかにするには, クローン病の感受性染色体座位 (位置的候補) と, クローン病病態解析より推測される感受性遺伝子 (候補) を分子遺伝学的に解析し, リンクさせる必要がある.

近年, クローン病感受性遺伝子候補の一つとして, 腫瘍壊死因子 (TNF)  $\alpha$  が注目されている. TNF  $\alpha$  はサイトカインの一種で, 炎症時の免疫応答に関与していると考えられている. 活動期クローン病においては, 血清・局所組織・便中の TNF  $\alpha$  が上昇し<sup>17,18)</sup>, この患者に対し抗 TNF  $\alpha$  抗体を投与すると, クローン病の臨床症状・組織活動性が低下改善する<sup>19-21)</sup> ことより TNF  $\alpha$  がクローン病の病態に深く関与していることが推察される. また, TNF  $\alpha$  遺伝子は第 6 染色体短腕上の HLA class II 領域の近傍に位置しているが, ここはクローン病の感受性染色体座位の一つである (3施設で肯定した結果を示し, 他は否定している). 日本人において, HLA DQB1\*04 がクローン病と positive に相関することが報告されている<sup>22)</sup>. さらに海外でも TNF 周囲のマイクロサテライトマーカーを用いて, TNF 座位近傍とクローン病との連鎖が示されている<sup>15)</sup>. すなわち TNF  $\alpha$  遺伝子そのもの, あるいはその近傍にクローン病の感受性遺伝子が存在していることが強く示唆される. 一般に, クローン病の感受性染色体座位及び感受性遺伝子候補のいくつかは民族によって若干異なることが報告されているが, それにもかかわらず第 6 染色体でのこれら国内外の共通した報告は, TNF  $\alpha$  遺伝子がクローン病の感受性遺伝子である可能性をさらに高める根拠となっている. では実際に遺伝子のどのような変化が, 疾患の危険因子



となるのであろうか。

もっとも考えられるのは遺伝子内の変異であるが、中でも近年、遺伝子多型が多因子遺伝病の危険因子のひとつとして注目されている。遺伝子多型とはある集団の1%以上に認められるDNA配列の変異である。多型の多くは明らかな表現型の違いをもたらさないが、転写機構・mRNAの安定性・蛋白の構造変化などを通して、その因子の量的、質的な変化をもたらす可能性がある。以前よりTNF $\alpha$ 遺伝子の5'側領域（ここはプロモーターやエンハンサーなど、TNF $\alpha$ 遺伝子の転写に影響を与えている可能性が高い）には、-308番目、-238番目の塩基に1塩基置換の多型があることが知られていたが、日本人では非常に低頻度であった。しかし、1998年には日本人で新たに3ヶ所の多型（-1031C、-863A、-857T）が報告された<sup>23)</sup>。これらの多型があると、*in vitro*でConA刺激によるTNF $\alpha$ の産生が増加することも示され<sup>23)</sup>、多型と機能との関連が予想される。一般にTNF $\alpha$ の産生には大きな個体差があるが、各個体内では比較的安定しており、*in vitro*での産生量を見ると一個体内での変動幅は、はなはだ15%以内である<sup>24)</sup>。また、一卵性双生児を用いたエンドキシン刺激によるTNF産生の研究では、おおよそ60%のTNF産生変動は遺伝的に決定されると報告されている<sup>25)</sup>。HLA-DR3をもつ個体は、HLA-DR2をもつ個体にくらべTNF $\alpha$ をより産生するという報告もある<sup>26)</sup>。これら、個体間のTNF $\alpha$ 産生の強弱が何によってもたらされるかは不明であるが、その一つに、遺伝子多型が関与している可能性が示唆される。

以上より、我々はTNF $\alpha$ 遺伝子5'側領域の新しい多型とクローン病との関係に注目し、これら多型がTNF $\alpha$ の産生を促すことでクローン病の病態に関与して遺伝的危険因子の一つとして作用していると考え、分子遺伝学的に解析を行った。

このような感受性遺伝子の相関研究では、集団の階層化をできるだけ少なくするために、単一民族での解析が好ましい。日本人はその外見上の類似性、および島国という地理的条件、さらには、とくに"倭人"とよばれる現在本州に多く分布する民族間でのHLA分布の一致性<sup>22), 27), 28)</sup>などより、遺伝的には比較的均一であると考えられ、本解析に非常に有利であると思われる。

## B. 研究方法

### 《対象》

本研究は、東北大学医学部附属病院第三内科に1998年5月から1999年1月の期間に受診した日本人炎症性腸疾患患者、クローン病103例（女性26、男性77、平均年齢32歳）および潰瘍性大腸炎76例（女性31、男性45、平均年齢38歳）を対象とした。575例の健常者データは樋口らのデータを使用した<sup>23)</sup>。クローン病および潰瘍性大腸炎は、臨床症状、内視鏡所見、X線検査所見、組織所見をもとに診断した。なお、一部多型（既知の-308A、-238A）では、クローン病54例、潰瘍性大腸炎54例を対象とした。

### 《シーケンスによる多型の解析》

被験者より血液を採取し、末梢血単核球からphenol-chloroform法あるいは、NA-1000自動核酸抽出機（倉紡、大阪）を用いてDNAを抽出した。続いてPerkin-Elmer 9600 thermal cycler (Perkin-Elmer, CT, USA)にてPCRを施行し、TNF $\alpha$ 遺伝子5'側領域の-1229~-188

塩基の部分を増幅した。このさい、PCRプライマーおよび条件設定は、樋口らの<sup>23)</sup>方法に従った（senseプライマー：5'-GCTTGTGTGTGTGTGTCTGG-3'、anti-senseプライマー：5'-GGACACACAAGCATCAAGG-3'、PCR条件：加熱変性94°C1分+アニーリング55°C2分+伸長反応72°C3分を40サイクル、72°C10分、4°C保存）。引き続きPCR生成物はMicrocon-100microconcentrators (Millipore, MA, USA)を用いて精製したのちApplied Biosystems Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer)を用いてシーケンス反応を行った。シーケンスプライマーは、-1031、-863、-857多型解析用に-782から-1209をシーケンスする5'-TGTGGCCATATCTTCTTAAA-3'、および、-308、-238多型解析用に-207から-426をシーケンスする5'-CCTCAAGGACTCAGCTTTCTG-3'の二種類を用いた。シーケンス反応生成物はCENTRI-SEP spin columns (PRINCETON SEPARATIONS, NJ, USA)にて精製したのち、Applied Biosystems Model 377（または310）automated DNA sequencer (Applied Biosystems, CA, USA)を用いて、DNA塩基配列を読み取った。

それぞれの多型は、--塩基置換されている部位と塩基名をあわせて命名した。すなわち-1031C（-1031番でのTからCへの塩基置換）、-863A（-863番でのCからAへの塩基置換）、-857T（-857番でのCからTへの塩基置換）、-308T（-308番でのGからAへの塩基置換）、-238T（-238番でのGからAへの塩基置換）とした。また、新しい多型があった場合にも同様に命名した。

### 《臨床型による分類比較》

クローン病、潰瘍性大腸炎の疾患別だけでなく、臨床パラメータにより細分類を行い、それぞれで比較検討した。すなわち、クローン病では、①病型（小腸型/小腸大腸型/大腸型）、②穿孔型か非穿孔型か、③肛門病変の有無、④ステロイド治療の有無（発症から5年以内に40mg/day以上のプレドニゾロンを必要としたか）、⑤手術の有無（発症から5年以内に、穿孔/瘻孔/狭窄/膿瘍などにより開腹手術を要したか）、および潰瘍性大腸炎では、①病型（直腸炎型/左側結腸炎型/全大腸炎型）、②強力静注療法（intensive intravenous steroid therapy<sup>29)</sup>）の必要性の有無（intensive intravenous steroid therapy<sup>29)</sup>に準じる。）、③手術の有無（発症から5年以内に、内科治療困難にて大腸切除を要したか）、に従い分類した。

### 《統計処理》

解析したシーケンスデータにもとづき、-1031、-863、-857、-308、-238の5ヶ所の多型について、野生型アレルのみ、野生型アレルと変異型アレル、変異型アレルのみ、の三つの遺伝子型別に頻度を求めた。また、変異型アレルを一本でも持っている場合の頻度は、キャリアー頻度とした。さらに、全アレルの合計本数のうち、変異しているアレルの割合を求め、アレル頻度とした。5ヶ所の多型について、疾患別にアレル頻度を計算し、 $\chi^2$ 検定を用いて比較した。さらに、臨床パラメータ分類別にアレル頻度を計算し、 $\chi^2$ 独立性の検定とBonferroni検定による多重比較を行った。以上より求められたP値が0.05未満の時、統計学的に有意であるとした。

C. 研究結果  
《疾患別による検討》

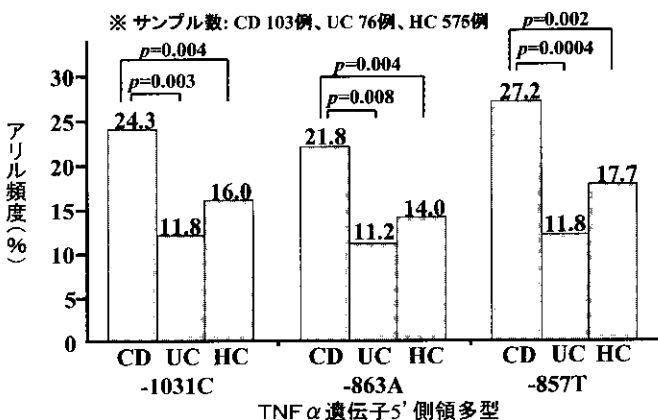
TNF  $\alpha$  遺伝子5'側領域-1031, -863, -857, -308, -238の塩基を解析・集計し、遺伝型、多型のアリル頻度、キャリア頻度、オッズ比をまとめたものを表1に示す。-308Cおよび-238Cのアリル頻度は、クローン病、潰瘍性大腸炎、健常コントロールとも1~2%と非常に低く、疾患との関連を評価することは出来なかった。一方、-1031C, -863A, -857T多型のアリル頻度をみると、健常コントロールでそれぞれ16.0%, 14.0%, 17.7%<sup>23)</sup>であるのに対し、クローン病では24.3%, 21.8%, 27.2%と有意に高い値となった。潰瘍性大腸炎では11.8%, 11.2%, 11.8%と若干低めの傾向を示すにとどまった(図1)。なお、-1031Cと-863Aはクローン病、潰瘍性大腸炎とも連鎖しており、樋口らの健常データの報告<sup>23)</sup>と同様であった。

表1 日本人 TNF  $\alpha$  遺伝子5'側領域多型の遺伝型、アリル頻度、キャリア頻度

多型の場所	遺伝型(数)			アリル頻度 (%)	キャリア頻度 (%)	オッズ比	95%CI <sup>a</sup>
	T/T	T/C	C/C				
-1031	CD <sup>a</sup> (n=103)	57	42	4	24.3	44.7	1.68 (1.18 ~ 2.39)
	UC <sup>b</sup> (n=76)	59	16	1	11.8	22.4	0.71 (0.42 ~ 1.18)
	HC <sup>c</sup> (n=576)	405	166	14	16.0	29.6	
-863	CD (n=103)	62	37	4	21.8	39.8	1.72 (1.19 ~ 2.48)
	UC (n=76)	60	15	1	11.2	21.1	0.77 (0.46 ~ 1.31)
	HC (n=576)	424	141	10	14.0	26.3	
-857	CD (n=103)	67	36	10	27.2	44.7	1.73 (1.23 ~ 2.43)
	UC (n=76)	60	14	2	11.8	21.1	0.82 (0.37 ~ 1.04)
	HC (n=576)	389	168	18	17.7	32.3	
-308	CD (n=54)	53	1	0	0.9	1.9	
	UC (n=54)	54	0	0	0.0	0.0	
	HC (n=576)	556	18	1	1.7	3.3	
-238	CD (n=54)	52	2	0	1.9	3.7	
	UC (n=54)	53	1	0	0.9	1.9	
	HC (n=576)	552	23	0	2.0	4.2	

<sup>a</sup>CD, クローン病 <sup>b</sup>UC, 潰瘍性大腸炎 <sup>c</sup>HC, 健常コントロール <sup>d</sup>CI, confidential interval

図1 クローン病 (CD), 潰瘍性大腸炎 (UC), 健常コントロール (HC) のアリル頻度

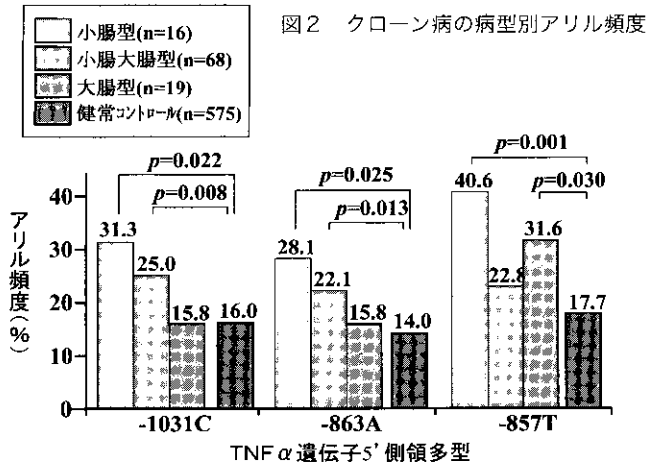


《クローン病の分類別による検討》

クローン病を、病型、穿孔型か非穿孔型か、肛門病変の有無、ステロイド治療の有無、手術の有無、に従って分類し、-1031C, -863A, -857Tの多型でアリル頻度の違いを検討した。殆どが20-25%のアリル頻度を示し、健常コントロールに対して有意に高い場合はあっても、各群間での有意な違いは見られなかった。唯一、-857T

において、ステロイド治療(-)群がステロイド治療(+)群と比較して、有意に高い値となった (p=0.009)。

興味深いことに、クローン病の病型別にアリル頻度を比較すると、-1031C, -863A, -857Tすべてで小腸型が最も高い値を示し、とくに連鎖している-1031C/-863Aでは小腸型>小腸大腸型>大腸型≒健常コントロールという順に高い頻度を示した(図2)。



《潰瘍性大腸炎の分類別による検討》

潰瘍性大腸炎を病型、強力静注療法の必要性の有無、手術の有無に従って分類し検討したところ、強力静注療法(+)群が、健常コントロールに対してのみ-857Tで有意に高い値を示した。他に有意な違いは認められなかった。

《TNF  $\alpha$  遺伝子5'側領域の新しい多型》

シーケンスした範囲内において、クローン病で2つの新しい多型を発見した。それは、クローン病患者2名で-1196T (-1196番C→T変異, アリル頻度1.9%)およびクローン病患者1名で-1125C (-1125番G→C変異, アリル頻度1.0%)である。潰瘍性大腸炎では新しい多型は認めなかった。疾患との関係についてはいまだ不明である。

D. 考察

現在、炎症性腸疾患の感受性遺伝子をつぎとめるために、欧米を中心に大規模な罹患同胞対を用いた連鎖解析が行われている。1996年Hugotらは炎症性腸疾患に対しゲノムスクリーニングを初めて施行し、クローン病と染色体16番との連鎖を示した<sup>9)</sup>。現在、染色体16番の感受性遺伝子候補としては、CD19, sialophorin, CD11 integrin, IL4レセプターらが考えられる。続いて1996年Satsangiらは186組の罹患同胞対を調べ炎症性腸疾患(クローン病・潰瘍性大腸炎とも)と染色体3, 7, 12番が連鎖することを示し、両疾患に共通の病因遺伝子がある可能性を示唆した<sup>10)</sup>。1998年ChoらはAshkenazi Jewishの血縁患者297組を調べ、炎症性腸疾患と染色体1番, 3番, 第4番との連鎖を報告し、またクローン病と染色体16番との連鎖を追認した<sup>12)</sup>。1998年Duerrらは英国において北米白人122家系をTDTs (Transmission/disequilibrium tests)を用いて解析し、炎症性腸疾患と染色体12番とのリンケージを示した<sup>13)</sup>。また、1999年Hampeらは353組の血縁患者を調べ炎症

性腸疾患と染色体1, 4, 6, 10, 12, 16, 22とのリンケージを報告した<sup>16)</sup>。これら数多くの炎症性腸疾患に対するリンケージ解析のなかで複数の人種間でも共通の染色体が12番 (IBD1) 16番 (IBD2) である。ただし、リンケージ解析に用いられる炎症性腸疾患患者は家族性に限られ、これは全炎症性腸疾患の十数パーセントであり、一部のサブタイプだけ示している可能性がある。また、リンケージ解析はrisk factorの一部のみ示しているだけで、全く環境要因が考慮されていないため、そのまま病因と直結して考えるのは危険である。今後は、これらリンケージ解析の結果をもとに実際の感受性遺伝子を検索する association study に重点が移っていくと思われるが、いまだ決定的な感受性遺伝子は報告されていない。

本研究では、クローン病感受性遺伝子座位の一つである第6染色体上のサイトカイン遺伝子 TNF  $\alpha$  に注目し、日本人炎症性腸疾患患者における TNF  $\alpha$  遺伝子5'側領域の多型をシーケンスにより解析、検討した結果、以下の新しい知見を得た。第一に、クローン病では -1031C/-863A (連鎖)、-857T のアリル頻度が、健常コントロールに比して有意に高く、潰瘍性大腸炎では全体にやや低めの傾向を示すこと。第二に、クローン病でのアリル頻度は小腸型で最も高く、これら多型がとくに小腸病変と関係している可能性が示唆されることである。TNF  $\alpha$  遺伝子5'側領域の多型とクローン病との相関は、二通りの解釈がある。一つは、この多型自体がクローン病の疾患感受性となっている場合、もう一つにはこの多型が近くに存在する真の疾患感受性遺伝子と連鎖している場合である。

前者となるためには、どのように疾患発現に関与するのかが問題になる。In vitro の検討では、末梢血単核球を concanavalin-A により刺激してみると -1031C/-863A、-857T の多型を持つことで、TNF  $\alpha$  産生量およびプロモーターの転写活性とも二倍近く高くなることが報告されている<sup>23)</sup>。よってこれらの多型が TNF  $\alpha$  の過剰産生を促し、クローン病発症に関与している可能性が考えられる。しかしこの多型の詳細な意義についてはまだまだ不明な点が多く、今後の研究を待たねばならない。

一方、他遺伝子との連鎖を考えた場合、現在のところ HLA 遺伝子が最も有力である。第6染色体短腕上には TNF  $\alpha$  遺伝子と HLA class II が近接して存在しており、この染色体座位とクローン病との重要性は、前述のものを含め数多く報告されている<sup>30-33)</sup>。特に、日本人において中島らが HLA DRB1\*0405/\*0410/\*0802, DQB1\*04 とクローン病が強く正相関することを示した<sup>22)</sup>、日本人 -857 T は HLA DRB1\*0405 とリンケージしていることが報告されており<sup>23)</sup>、結果としてクローン病と -857T が正相関するという我々の結果と矛盾しない。これに対して、-1031C/-863A は HLA DRB1\*0901 とリンケージするとされている<sup>23)</sup>、HLA DRB1\*0901 クローン病との相関は見られず、したがって、-1031C/-863A は少なくとも HLA と無関係にクローン病と相関していると考えられる。

なお、-1031C/-863A、-857T は HLA DRB1\*1502 と negative にリンクすること<sup>23)</sup>、その HLA DRB1\*1502 は潰瘍性大腸炎と正相関すること<sup>34)</sup>が報告されており、よって -1031C/-863A、-857T は潰瘍性大腸炎と負相関すると予想される。実際に本研究では -1031C/-863A、-857T の3多型のアリル頻度が、潰瘍性大腸炎において健常コントロールより低めの傾向を示した。HLA との

リンケージから考える限り、症例数が増えれば有意に低頻度となると思われる。

クローン病は、患者血縁者の高い発症率から遺伝的背景が大きいと考えられ、疫学的・臨床的検討から、非メンデル型遺伝の多因子遺伝疾患であることが知られている。また、クローン病はいくつかのサブタイプの集まりで、臨床的異質性を示すとともに、遺伝的異質性をも持つと予想されている。そのため、クローン病の感受性遺伝子は複数存在していると考えられ、感受性遺伝子候補の検討においては、臨床的異質性、遺伝的異質性を考慮に入れて、クローン病をさまざまなパラメータにより重型分類して検討することが重要である。本研究では、病型別分類すなわち病変の存在部位が少なからず関係していることが示された。-1031C、-863A、-857T とも小腸型クローン病で高いアリル頻度となる一方、大腸型クローン病では健常コントロールと同程度であった。病型分類された症例数が少なく、各病型間での有意差は認められないが、少なくともクローン病全体で見られた本多型と疾患との相関が、クローン病の中の小腸型に由来していることが推察される。さらに小腸大腸型で、小腸型と大腸型の間での頻度となっていること、潰瘍性大腸炎ではむしろやや低めの傾向を示したこともあわせると、-1031C/-863A が大腸病変でなく小腸病変と positive に関連している印象である。ちなみに、小腸型ベッチェット6例で検討したところ、-1031C/-863A のアリル頻度は50%に達していた(データ未提示)。一方、TNF  $\alpha$  の炎症への作用を考えると、肛門部病変、瘻孔、膿瘍などとの相関が予想されたが、有意差は認められなかった。今後、より多くの症例でより詳細な分類のもとに再検討する必要があると考えられる。例えば、クローン病の肛門部病変に抗 TNF  $\alpha$  抗体を用いた場合、比較的效果がある症例と、治療に抵抗性の症例とに分かれることが知られており、本多型との関係が興味深い。

さらにこれらの多型とクローン病との関係は、より多くの症例で、また異なる人種でも検討し、高いアリル頻度が単に連鎖によるものなのか、独立に病因の危険因子となっているか、そして病因となるならばどのようなメカニズムで作用するのかを、今後も解析する必要がある。

## E. 参考文献

- 1) Satsangi J, Rosenberg WM, Jewell DP: The prevalence of inflammatory bowel disease in relatives of patients with Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1994;6:413-416.
- 2) McConnell R, Vadheim C: *Inflammatory bowel disease* Oxford University Press. Oxford, 1992:326-348.
- 3) Tysk C, Lindberg E, Järnerot G, et al: Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut*, 1988:990-996.
- 4) Satsangi J, Jewell DP, Rosenberg WM, et al: Genetics of inflammatory bowel disease. *Gut* 1994;35:696-700.
- 5) Yang H, Rotter JI: Genetics of inflammatory bowel disease. In: Targan SR, Shanahan F, eds. *Inflammatory bowel disease: from bench to bedside*. Baltimore, MD: Williams & Wilkins, 1994:32-64.
- 6) Orholm M, Munkholm P, Langholz E, et al: Familial

- occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 1991;324:84-88.
- 7) Probert CS, Jayanthi V, Hughes AO, et al: Prevalence and family risk of ulcerative colitis and Crohn's disease: an epidemiological study among Europeans and south Asians in Leicestershire. *Gut* 1993;34:1547-1551.
  - 8) Kuster W, Pascoe L, Purmann J, et al: The genetics of Crohn disease: complex segregation analysis of a family study with 265 patients with Crohn disease and 5,387 relatives. *Am J Med Genet* 1989;32:105-108.
  - 9) Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, et al: Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 1996;379:821-823.
  - 10) Satsangi J, Parkes M, Louis E, et al: Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. *Nat Genet* 1996;14:199-202.
  - 11) Curran ME, Lau KF, Hampe J, et al: Genetic analysis of inflammatory bowel disease in a large European cohort supports linkage to chromosomes 12 and 16. *Gastroenterology* 1998;115:1066-1071.
  - 12) Cho JH, Nicolae DL, Gold LH, et al: Identification of novel susceptibility loci for inflammatory bowel disease on chromosomes 1p, 3q, and 4q: evidence for epistasis between 1p and IBD1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:7502-7507.
  - 13) Duerr RH, Barmada MM, Zhang L, et al: Linkage and association between inflammatory bowel disease and a locus on chromosome 12. *Am J Hum Genet* 1998;63:95-100.
  - 14) Mirza MM, Lee J, Teare D, et al: Evidence of linkage of the inflammatory bowel disease susceptibility locus on chromosome 16 (IBD1) to ulcerative colitis. *J Med Genet* 1998;35:218-221.
  - 15) Yang H, Plevy SE, Taylor K, et al: Linkage of Crohn's disease to the major histocompatibility complex region is detected by multiple non-parametric analyses. *Gut* 1999;44:519-526.
  - 16) Hampe J, Schreiber S, Shaw SH, et al: A genomewide analysis provides evidence for novel linkages in inflammatory bowel disease in a large European cohort. *Am J Hum Genet* 1999;64:808-816.
  - 17) Breese EJ, Michie CA, Nicholls SW, et al: Tumor necrosis factor alpha-producing cells in the intestinal mucosa of children with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1994;106:1455-1466.
  - 18) de Silva DG, Mendis LN, Sheron N, et al: TNF alpha in stool as marker of intestinal inflammation. *Lancet* 1992;340:372.
  - 19) Stack WA, Mann SD, Roy AJ, et al: Randomised controlled trial of CDP571 antibody to tumour necrosis factor-alpha in Crohn's disease. *Lancet* 1997;349:521-524.
  - 20) Derkx B, Taminiou J, Radema S, et al: Tumour-necrosis-factor antibody treatment in Crohn's disease. *Lancet* 1993;342:173-174.
  - 21) van Dullemen HM, van Deventer SJ, Hommes DW, et al: Treatment of Crohn's disease with anti-tumor necrosis factor chimeric monoclonal antibody (cA2). *Gastroenterology* 1995;109:129-135.
  - 22) Nakajima A, Matsushashi N, Kodama T, et al: HLA-linked susceptibility and resistance genes in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1995;109:1462-1467.
  - 23) Higuchi T, Seki N, Kamizono S, et al: Polymorphism of the 5'-flanking region of the human tumor necrosis factor (TNF) -alpha gene in Japanese. *Tissue Antigens* 1998;51:605-612.
  - 24) Entzian P, Linnemann K, Schlaak M, et al: Obstructive sleep apnea syndrome and circadian rhythms of hormones and cytokines. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:1080-1086.
  - 25) Westendorp RG, Langermans JA, Huizinga TW, et al: Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. *Lancet* 1997;349:170-173.
  - 26) Jacob CO, Fronck Z, Lewis GD, et al: Heritable major histocompatibility complex class II-associated differences in production of tumor necrosis factor alpha: relevance to genetic predisposition to systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:1233-1237.
  - 27) Imanishi T, Akaza T, Kimura A, et al: Allele and haplotype frequencies for HLA and complement loci in various ethnic group. In: Tsuji K, ed. *HLA* 1991. New York: Oxford, 1992:1065-1220.
  - 28) Yoshitake S, Kimura A, Okada M, et al: HLA class II alleles in Japanese patients with inflammatory bowel disease. *Tissue Antigens* 1999;53:350-358.
  - 29) Truelove SC, Jewell DP: Intensive intravenous regimen for severe attacks of ulcerative colitis. *Lancet* 1974;1:1067-1070.
  - 30) Forcione DG, Sands B, Isselbacher KJ, et al: An increased risk of Crohn's disease in individuals who inherit the HLA class II DRB3\*0301 allele. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:5094-5098.
  - 31) Toyoda H, Wang SJ, Yang HY, et al: Distinct associations of HLA class II genes with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1993;104:741-748.
  - 32) Danze PM, Colombel JF, Jacquot S, et al: Association of HLA class II genes with susceptibility to Crohn's disease. *Gut* 1996;39:69-72.
  - 33) Duerr RH, Neigut DA: Molecularly defined HLA-DR2 alleles in ulcerative colitis and an antineutrophil cytoplasmic antibody-positive subgroup. *Gastroenterology* 1995;108:423-427.
  - 34) Futami S, Aoyama N, Honsako Y, et al: HLA-DRB1\*1502 allele, subtype of DR15, is associated with susceptibility to ulcerative colitis and its progression. *Dig Dis Sci* 1995;40:814-818.

## 直接シーケンシングによる HLA-DRB タイピング — 家族性を有する IBD 症例での検討 —

分担研究者 棟方 昭博 弘前大学医学部 第一内科 教授

研究要旨: オートシーケンサを用いた直接シーケンシングにより家族性を有する炎症性腸疾患 (IBD) の2家系で HLA-DRB のタイピングを行った。DNA の抽出は末梢血から行い、PCR 法により HLA-DRB1 遺伝子を増幅後、サイクルシーケンシングを行いオートシーケンサを用いて解析した。最初の家系は父が潰瘍性大腸炎 (UC)、母がクローン病 (CD)、2人の子のうち第2子が UC という家系。もう1家系は健常な両親から生まれた4人の子のうち、第3子が UC、第4子が CD という家系であった。タイピングの結果、最初の家系では HLA-DRB1\*1304、\*1301、\*1407、\*0801 のアレルがみられ、2番目の家系では第3子が HLA-DRB1\*1601、第4子が HLA-DRB1\*0803 であった。2家系の中にはこれまで疾患感受性が指摘されているアレルは認められなかった。直接シーケンシングでは塩基配列やヘテロな塩基対を直接決定でき HLA-DRB のタイピング法として有用と考えられた。

### 共同研究者

田村 好弘, 渡辺 智子, 福田 真作,  
対馬 健一

所属 弘前大学医学部 第一内科

### A. 研究目的

HLA (human leukocyte antigen) -DRB の DNA タイピングにはこれまで主に PCR-SSO (polymerase chain reaction - sequence specific oligonucleotide) 法が用いられてきた。この方法は一度に多数の検体を扱えるという面で優れているが、欠点としてはハイブリダイゼーション後の洗浄に時間と労力を要すること、DNA タイプの決定までに複数回のハイブリダイゼーションが必要であることが挙げられる。直接シーケンシングは塩基配列 (多型) の決定には最も直接的な方法であるが、手技的に時間がかかり煩雑であるとされてきた。しかし、近年、オートシーケンサの利用が可能となりシーケンシングの効率が大幅に向上し利用価値は大きくなっている。HLA は遺伝的素因であると同時に種々の疾患の疾患感受性に関与している。HLA-DRB1 遺伝子産物は HLA クラス 2 抗原を構成し、また、HLA 遺伝子の中でも特に多様性に富んでいることから注目されている。日本の炎症性腸疾患においては HLA-DRB1\*1502、DQB1\*0402、HLA-DRB1\*0410 のアレルに疾患感受性があると報告されている。今回われわれは HLA-DRB のタイピング法として直接シーケンシング法を利用し、家族性を有する IBD の2家系で DNA タイピングを行った。

### B. 研究方法

genomic DNA の抽出を末梢血から行い、PCR 法により HLA-DRB1 遺伝子のエクソン 2 を増幅した。プライマーは 5'-CCCCACAGCACGTTTCTTG-3' および 5'-CCGCTGCACTGTGAAGCTCT-3' とした。PCR 産物をアガロースゲルで泳動し、エチジウムブロマイド染色で確認した。PCR 産物を鋳型としてダイターミネータを用いたサイクルシーケンシングを行った。キャピラリー電気泳動を用いたオートシーケンサ (ABI PRISM 310) でシーケンシングを行った。シーケンシングプライマーは sense strand 5'-TTCTTCAATGGGACGGAGCG-3', anti-sense strand 5'-ACCCCGTAGTTGTGTCTGCA-3' を用いた。sense, anti-sense の両鎖の塩基配列を決定した。

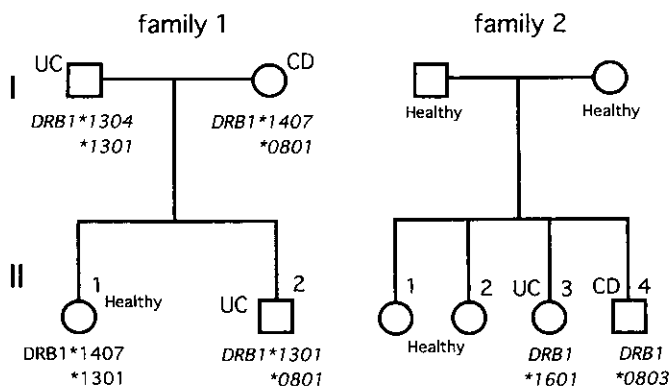
今回タイピングを行った2家系の内、最初の家系は父 (44) が潰瘍性大腸炎 (UC)、母 (43) がクローン病 (CD)、2人の子のうち第2子 (13) の長男が UC という家系である。この父は 22 歳時に発症、全大腸炎のため同年全大腸切除を受けている。母は 24 歳時に発症し、その後3度の再燃がみられている。第1子は 16 歳で健常である。第2子は 11 歳時に発症し、3度目の再燃の際にステロイド治療が奏功せず、全大腸切除を受けている。もう1家系は健常な両親から生まれた4人の子のうち、第3子 (27) の3女が UC、第4子 (19) の長男が CD という家系である。第3子は 15 歳時に左側大腸炎で発症し現在まで再燃、寛解を繰り返している。第4子は 18 歳時に腹痛、体重減少などで発症し、現在は寛解中である。

### C. 研究結果

直接シーケンシングによるタイピングでは HLA-DRB1 遺伝子エクソン 2 のほぼ全長の塩基配列を 1 度の

シーケンシングで決定可能であった。また、多型を有する部位のヘテロな塩基対は2塩基同時に検出可能であった。タイピングの結果、最初の家系ではHLA-DRB1\*1304, \*1301, \*1407, \*0801のアレルがみられ、2番目の家系では第3子がHLA-DRB1\*1601, 第4子がHLA-DRB1\*0803であった(図1)。

図1 Pedigrees of the Family and HLA-DRB Genotypes



#### D. 考 察

HLA アレルは遺伝的に受け継がれる遺伝的素因であり、また、免疫応答に深く関与している。種々の疾患においてある種の HLA アレルとその疾患の疾患感受性との間に相関が指摘されている。IBDにおいてもこれまで欧米からは UC で HLA-DRB1\*0103, HLA-DRB1\*1502, CD では HLA-DRB1\*07 のアレルや HLA-DRB3\*0301/HLA-DRB1\*1302 のハプロタイプに疾患感受性があると報告されている<sup>1-5)</sup>。また、日本の炎症性腸疾患においては UC では HLA-DRB1\*1502, CD では DQB1\*0402, HLA-DRB1\*0410 のアレルに疾患感受性があると報告されている<sup>6-8)</sup>。

HLA アレルが疾患に関与する機序としては大きく 2 通りが考えられている。ひとつは HLA 蛋白そのものが疾患の発症に関与しているとするもの、すなわち、HLA 蛋白とある種の異物との結合物は効果的な免疫反応を引き起こさず慢性の炎症を引き起こす場合、あるいは、ある種の HLA アレルが宿主の抗原と交差反応し正常な細胞が破壊される場合である。もうひとつの機序は疾患感受性のあるアレルと連鎖不均衡を示す、すなわち、強く相関した別の遺伝子が疾患の原因となっているというものである。

一般に IBD の発症には遺伝的素因および環境因子が関与しているとされる。家族性のある IBD 症例においては散発例に比べより強い遺伝的背景を有していると考え、今回われわれは IBD が家族内集積した 2 家系において HLA-DRB1 遺伝子に注目し DNA タイピングを行った。この 2 家系のなかにはこれまで疾患感受性が報告されている genotype は認められず、HLA そのものが関与したかどうか推察することは不能であった。しかし、これらの症例では遺伝的素因の存在はほぼ確実と思われ、

HLA 以外の遺伝子の検索していくことは IBD の疾患感受性を考える上で有意義と考えられた。

従来、HLA-DR の DNA タイピングにはドットプロットハイブリダイゼーションを利用する PCR-SSO 法が多く用いられてきた。この方法は 1 枚のメンブレンに多数の検体を固定することができるため、多数の症例、コントロールを用いる研究に優れた方法である。しかし、多型の検出のため、プローブハイブリダイゼーション後のメンブレンの洗浄には時間と労力を要し、また、DNA タイプの決定までに複数回のハイブリダイゼーションが必要である。直接シーケンシング法は多型の検出には最も直接的な方法であるが、これまで手技的には煩雑で時間もかかると思われてきた。しかし、近年オートシーケンサの利用が可能となりシーケンシングの効率が大幅に向上している。このためいわゆる遺伝子の DNA タイピングの上でも利用価値は大きくなってきているといえる。今回、DNA タイピングには直接シーケンシング法を用いた。オートシーケンサを用いた直接シーケンシングによる HLA-DRB タイピングではエクソン 2 のほぼ全長の塩基配列を 1 度のシーケンシングで決定可能であった。また、ヘテロな塩基対も 2 塩基同時に検出可能であった。このことから HLA-DRB を含め遺伝子の DNA タイピング法として有用な方法であると考えられた。

#### E. 参考文献

- 1) Roussomoustakaki M, Satsangi J, Welsh K, et al: Genetic markers may predict disease behavior in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1997;112:1845-1853.
- 2) Reinshagen M, Loeliger C, Kuehn P, et al: HLA class · gene frequencies in Crohn's disease: a population based analysis in Germany. *Gut* 1996;38:538-542.
- 3) Cariappa A, Sands B, Forcione D, et al: Analysis of MHC class · DP, DQ and DR alleles in Crohn's disease. *Gut* 1988;43:210-215.
- 4) Uyar FA, Imeryuz N, Saruhan-Direskeneli G, et al: The distribution of HLA-DRB alleles in ulcerative colitis patients in Turkey. *Eur J Immunogenet* 1998;25:293-296.
- 5) Bouma G, Oudkerk-Pool M, Crusius JB, et al: Evidence for genetic heterogeneity in inflammatory bowel disease (IBD); HLA genes in the predisposition to suffer from ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD). *Clin Exp Immunol* 1997; 109:175-179.
- 6) Futami S, Aoyama N, Honsako Y, et al: HLA-DRB\*1502 allele, subtype of DR15 is associated with susceptibility to ulcerative colitis and its progression. *Digestive Diseases and Sciences* 1995;40:814-818.
- 7) Masuda H, Nakamura Y, Tanaka T, et al: Distinct relationship between HLA-DR genes and intractability of ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1994;89:1957-1962.
- 8) Nakajima A, Matsuhashi N, Kodama T, et al: HLA-linked susceptibility and resistance genes in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1995;109:1462-1467.

厚生科学研究費補助金特定疾患対策研究事業  
 「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究」班  
 分担研究報告書

MHC クラス I 関連遺伝子における三塩基反復配列多型と  
 潰瘍性大腸炎発症年齢との関連

分担研究者 杉村 一仁 新潟大学医学部 第三内科 助手

研究要旨：[目的] 近年発見された MHC クラス I 関連遺伝子 (MICA) は、HLA-B 遺伝子の近傍に存在する。MICA 分子は消化管上皮に特異的に発現され、消化管  $\gamma\delta$  T 細胞に認識される。MICA 遺伝子はその膜貫通領域に三塩基反復配列多型を示す。我々は潰瘍性大腸炎とこの多型との関連を検討した。[方法] 57 例の潰瘍性大腸炎患者と 132 例の非血縁コントロール症例の末梢血から、体性 DNA が抽出され、MICA 遺伝子多型性が直接シーケンシング法によって決定された。[結果] 潰瘍性大腸炎患者において、MICA A6 対立遺伝子の遺伝子頻度及び保有率に有意な増加を認めた (allelic frequency:  $P_c=0.00026$ , carriage rate:  $P_c=0.016$ )。A6 対立遺伝子のホモ接合体患者は A6 対立遺伝子を持たない患者に比して、有意にその発症年齢が若かった ( $P < 0.004$ )。[結語] MICA A6 対立遺伝子の表現形は密接に潰瘍性大腸炎の発症年齢と関連していた。潰瘍性大腸炎の二峰性発症を理解する上で重要と考えられた。

共同研究者

松澤 純, 石塚 基成, 望月 剛, 関 鈴子,  
 本間 照, 朝倉 均<sup>1)</sup>, 太田 正穂,  
 勝山 義彦<sup>2)</sup>, 水木 信久<sup>3)</sup>, 猪子 英俊<sup>4)</sup>,

所属 新潟大学医学部 第三内科<sup>1)</sup>,  
 信州大学医学部 法医学<sup>2)</sup>,  
 横浜市立大学医学部 眼科<sup>3)</sup>,  
 東海大学医学部 遺伝情報<sup>4)</sup>

A. 研究目的

潰瘍性大腸炎における双生児・家庭内・民族間・移民グループにおける発症の検討によって、潰瘍性大腸炎の発症に遺伝的な因子が関与していることが明らかとなっている<sup>1)</sup>。HLA 対立抗原や HLA 領域に存在する非 HLA 遺伝子群は、潰瘍性大腸炎疾患感受性因子として年余に渡り検討されてきた。潰瘍性大腸炎患者 HLA クラス I 対立抗原においては、アシュケナジム系ユダヤ人において B35<sup>2)</sup> が、日本人においては B52<sup>3)</sup> が、フィンランド人において Cw7<sup>4)</sup>、アジアインド人において A33<sup>5)</sup> 等の対立抗原保有者の有意な増加が報告されている。クラス II 抗原においては、日本人と民族補正されたカリフォルニア住民において DR2<sup>3,6)</sup> の増加が報告されている。近年の遺伝子タイピングを用いた詳細な検討は、日本・カリフォルニアにおける DRB1\*1502<sup>6,7)</sup> や日本の DPB1\*0901<sup>8)</sup>、英国・オランダにおける DRB1\*0103<sup>9,10)</sup> 保有者の増加を明らかとしてきた。これらの報告において、潰瘍性大腸炎患者における DRB1\*1502 対立遺伝子

保有者の増加が最も共通して認められる結果であるが、北ヨーロッパ非ユダヤ系住民においては DRB1\*1502 の増加は確認されていない。混合した民族性や対象症例数の不適性、対象における DRB1\*1502 対立遺伝子頻度の低さ等によってこのような矛盾する結果が得られている可能性も考えられる。しかし、これらの報告の患者群における DRB1\*1502 保有頻度の低さは、HLA 領域内に存在する潰瘍性大腸炎疾患責任遺伝子が DRB1\*1502 と連鎖不平衡の関係にあることを示しているだけなのかもしれない。

我々は以前より潰瘍性大腸炎患者において A24-C blank-B52-DR2-DQw1-DPw9 ハプロタイプ、とりわけ B52-DR2 領域が強く保存されていることを報告してきた<sup>8)</sup>。HLA クラス III 全体とクラス I のセントロメア側を含むこの領域には、多数の非古典的 HLA 遺伝子が存在している。MHC クラス I 関連遺伝子 A (MICA) は近年この領域に同定された遺伝子であり、HLA-B 遺伝子の約 40kb セントロメア側に位置している<sup>12)</sup>。MICA 遺伝子細胞外ドメインの共通アミノ酸配列は、MHC クラス I 抗原と 15-36% の相同性を示すが<sup>12)</sup>、MICA 抗原は消化管上皮に選択的に表出され<sup>13)</sup>、腸管上皮内  $V\delta 1$  T 細胞によって認識され、消化管上皮に存在する  $V\delta 1$  T 細胞の消化管保護的な作用を制御していると考えられている。加えて潰瘍性大腸炎末梢血内において  $V\delta 1$  T 細胞の増加も報告されている<sup>14,15)</sup>。

MICA 遺伝子細胞外ドメイン塩基配列の検討より、少なくとも 16 の対立遺伝子の存在と、その膜貫通領域に三塩基反復配列多型を示すことが明らかとなっている<sup>16)</sup>。この多型は GCT/AGC の 4,5,6,9 回の反復と、5 回反復に G/C 挿入の加わった多型が存在することが、

HLAホモ接合体B細胞の検討から明らかとなった<sup>17)</sup>。これらの対立遺伝子多型は各々 A4, A5, A6, A9, A5.1 と名付けられている。我々は、この三塩基配列多型と潰瘍性大腸炎との関連について検討を行った。

## B. 研究方法

57例の潰瘍性大腸炎患者と132例の非血縁健常者がこの検討に用いられた。潰瘍性大腸炎の診断は厚生省指針により行われた。発症年齢は最初に信頼できる症状の現れた年齢を用いた。潰瘍性大腸炎患者の内訳は、男性33例・女性24例、全大腸炎型57例、左側結腸型14例、直腸炎型7例であった。対象者より研究の詳細を説明した上で末梢血より体性DNAが抽出され検討された。MICA遺伝子膜貫通領域の三塩基反復配列多型は、従来の報告に従いプライマーを作成し、蛍光PCRプライマーを用いた直接シーケンシング法によって決定された<sup>18)</sup>。対立遺伝子頻度と保有者頻度は、2x2表を用いたカイ二乗検定を用いて検討された。すべてのP値は対立遺伝子数によって補正され、5%以下のP値を有意とした。MICA対立遺伝子と発症年齢との関連はノンパラメトリック法により検討された。

## C. 研究結果

潰瘍性大腸炎患者における、MICA遺伝子膜貫通領域に存在するマイクロサテライト多型の遺伝子頻度(表1)と保有者頻度(表2)を示す。潰瘍性大腸炎患者において、有意なMICA A6対立遺伝子頻度の増加(chi sq. = 16.38, Pc=0.00025)を認めた。潰瘍性大腸炎患者におけるA6保有者頻度は同様に有意に増加していた。潰瘍性大腸炎患者におけるA6保有率は約70%にのぼり、相対危険率は2.66であった。

Table 1. Allelic frequencies of the microsatellite polymorphism in the TM region of the MICA in ulcerative colitis.

MICA allele	patient (n=114) positive (n)	%	control (n=264) positive (n)	%	χ <sup>2</sup>	Pc value
A4	8	7.0	38	14.4		
A5	24	21.5	80	30.3		
A5.1	9	7.9	39	14.8		
A6	53	46.5	67	25.4	16.38	0.00026
A9	20	17.5	40	15.2		

Pc value has been corrected for the number of allele determined

Table 2. Carriage rates of the microsatellite polymorphism in the TM region of the MICA in ulcerative colitis.

MICA allele	patient (n=57) positive (n)	%	control (n=132) positive (n)	%	R.R.	χ <sup>2</sup>	Pc value
A4	8	14.0	34	25.8			
A5	21	36.8	71	53.8			
A5.1	9	15.8	36	27.3			
A6	40	70.2	62	47.0	2.66	8.63	0.016
A9	20	35.1	37	28.0			

Pc value has been corrected for the number of allele determined

全大腸炎型を示す患者ではA6対立遺伝子保有者は増加していたが(72.2%, Pc=0.035)、直腸炎型を示す患者ではA6保有者頻度は正常と比較して有意な保有率の変化を認めなかった(57.1% vs. 47.0%)。

より詳細な検討をするために、潰瘍性大腸炎患者の臨床状態がMICA A6表現形別に比較検討された。(表3)に示すように、A6ホモ接合体の患者ではA6を持った患者に比して有意に早期の発症パターンを示した。(H0=5.991 and H=9.863 by Kruskal-Wallis test, P=0.0038 by Scheffe's F)。A6ホモ接合体患者における発症中央

値は18才であり、ヘテロ接合体における発症中央値は23才、A6を保有しない患者における発症中央値は41才であった。A6表現形別において、男女比・喫煙習慣において明らかなバイアスは認められなかった。(図1)に、A6表現形別の積算発症曲線を示す。A6ホモ接合体患者のうち92%の患者は30才までに発症していたが、A6を示さない患者では30才までの発症率は35%であった。A6ヘテロ接合体患者群でその発症は上記二群の中間的なパターンを示した。

Table 3. Age at diagnosis of ulcerative colitis in the patients with and without MICA A6 phenotypes

MICA A6	homozygous	heterozygous	without A6
Number	13	27	17
Age at onset (yr)	18 (8-54)*	23 (11-59)	41 (13-64)
Sex (M/F)	9/4	14/13	10/7
Smoking habits at onset. (non: former: smoker)	13: 0: 0	22: 3: 2	13: 1: 3

\*: P = 0.0038 vs. without A6. \*Age at onset\* is expressed as median (range).

Figure 1

Cumulative onset rate (%)



Figure 1. Cumulative onset rate of ulcerative colitis in patients with and without the MICA A6 allele. The A6 homozygous patients showed earlier onset of ulcerative colitis than patients without the A6 allele. Black circle: A6 homozygous patients (n = 13), white circle: A6 heterozygous patients (n = 27), white square: patients without A6 allele (n = 17).

## D. 考察

今日まで、潰瘍性大腸炎とHLAとの関連機序を理解するために、HLA抗原・HLA遺伝子・HLA領域に存在する非HLA遺伝子やマイクロサテライトマーカー等の多くの因子が検討されてきた。これらの観察は、HLA領域には潰瘍性大腸炎の発症とその病態に關与する重要な因子が存在することを示している。

我々は、今回の検討において潰瘍性大腸炎とMICA A6対立遺伝子との密接な関連を認めた。MICA遺伝子はその存在位置から類推されるように、HLA-B対立抗原との密接な連鎖不均衡の關係にあることが、HLAホモ接合体B細胞ラインからの検討で明らかとなっている<sup>17)</sup>。日本人において、A6対立遺伝子はHLA-B52・B44・B51と連鎖不均衡の關係にある<sup>19)</sup>。HLA-B52は日本人におけるよく知られた潰瘍性大腸炎疾患感受性抗原であるが、加えて我々は以前の検討でB52を示さない患者群においてHLA-B44の増加傾向を認めている<sup>8)</sup>。しかしHLA-B51対立抗原頻度の増加は、日本人潰瘍性大腸炎患者では認められないので<sup>3,8)</sup>、MICA A6対立遺伝子が直接の潰瘍性大腸炎疾患責任遺伝子であると考えること



は出来ないであろう。むしろMICA A6対立遺伝子と潰瘍性大腸炎の関連は、潰瘍性大腸炎の疾患責任遺伝子がMICAに近いセントロメア側に存在していることを表していると考えている。

一方、A6対立遺伝子を持ついくつかのハプロタイプは潰瘍性大腸炎の発症と密接に関連していた。A6ホモ接合体患者の大多数は30才以下の発症を示すが、A6を保有しない患者群の発症はその学童・成年期をとおしてほぼ一定であった。Delpreらは、ユダヤ人潰瘍性大腸炎患者における観察で、30才以下の早期発症群においてHLA-A24対立抗原の増加を報告している<sup>2)</sup>。我々の以前の検討においても、早期発症群におけるHLA-B52対立抗原頻度は晩期発症群に比べ高い傾向にあることを観察している<sup>3)</sup>。当研究において我々はA6表現形と発症年齢との関連において量依存的な関連までも認めている。加えて、HLAクラスII抗原領域に存在する疾患マーカーと発症年齢との関連についての報告は今までに認められていない。このことは、ハプロタイプ組換えの歴史を考慮すると、HLAクラスIII領域のよりクラスI領域に近い部分に疾患責任遺伝子が存在することによって説明が可能であると考えられる。

この20年の間、潰瘍性大腸炎は二峰性の発症年齢分布を示すことが報告されてきた<sup>20-24)</sup>。民族によって細部は異なるが、これらの研究は潰瘍性大腸炎の発症は15才から25才までに最初の発症の増加が存在し、続いて45才から55才に次の発症の危険がやってくることを明らかとしている。二峰性の発症分布は、I型糖尿病<sup>25)</sup>・ホジキン病<sup>26)</sup>・重症筋無力症<sup>27)</sup>等でも報告されている。この二峰性発症の観点から、これらの疾患の原因に関して多くの検討が行われている。潰瘍性大腸炎に関しては、この二峰性発症は異なった2つの疾患の混合であることや、全く異なった2つの誘因があることが示唆されてきた<sup>28)</sup>。しかしながら、我々の検討は潰瘍性大腸炎の発症は疾患感受性遺伝子の表現形によって大きな影響を受け、このことが潰瘍性大腸炎の二峰性発症の原因となっている可能性を示唆している。このように考えると民族によって異なる二峰性発症の程度は、民族によって異なる疾患感受性遺伝子の対立遺伝子頻度によって説明されるかもしれない。

今後様々な民族のMICA遺伝子多型性を検討することによって、潰瘍性大腸炎の発症と疾患感受性遺伝子の局在について多くの情報が得られると考えられる。

#### E. 参考文献

- 1) Satsangi J, Jewell DP, Bell JI: The genetics of inflammatory bowel disease. *Gut* 1997;40:572-4.
- 2) Delpre G, Kadish U, Gazit E, Joshua H, Zamir R: HLA antigens in ulcerative colitis and Crohn's disease in Israel. *Gastroenterology* 1980;78:1452-7.
- 3) Asakura H, Tsuchiya M, Aiso S, et al: Association of the human leukocyte-DR2 antigen with Japanese ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1982;82:413-8.
- 4) Leidenius MHK, Koskimies SA, Kellokumpu IH, Hokerstedt KAV: HLA antigens in ulcerative colitis and primary sclerosing cholangitis. *APMIS* 1995;103:519-24.
- 5) Habeeb MA, Rajalingam R, Dhar A, Kumar A, Sharma MP, Mehra NK: HLA association and occurrence of autoantibodies in Asian-Indian patients with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1997;92:772-6.
- 6) Toyoda H, Wang SJ, Yang HY, et al: Distinct associations of HLA class II genes with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1993;104:741-748.
- 7) Futami S, Aoyama N, Honsako Y, et al: HLA-DRB1\*1502 allele, subtype of DR15, is associated with susceptibility to ulcerative colitis and its progression. *Digest Dis Sci* 1995;40:814-8.
- 8) Sugimura K, Asakura H, Mizuki N, et al: Analysis of genes within the HLA region affecting susceptibility to ulcerative colitis. *Hum Immunol* 1993;36:112-8.
- 9) Roussomoustakaki M, Satsangi J, Welsh K, et al: Genetic markers may predict disease behavior in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1997;112:1845-53.
- 10) Bouma G, Crusius JB, Garcia-Gonzalez MA, et al: Genetic markers in clinically well defined patients with ulcerative colitis (UC). *Clin Exp Immunol* 1999;115:294-300.
- 11) Satsangi J, Parkes M, Louis E, et al: Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. *Nat Genet* 1996;14:199-202.
- 12) Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, Spies T: A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:6259-63.
- 13) Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M, Spies T: Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:12445-50.
- 14) Groh V, Steinle A, Bauer S, Spies T: Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science* 1998;279:1737-40.
- 15) Soerstro K, Bucht A, Halapi E, Groberg A, Magnusson I, Kiessling R: Increased frequency of abnormal gamma delta T cells in blood of patients with inflammatory bowel diseases. *J Immunol* 1996;156:2331-9.
- 16) Fodil N, Laloux L, Wanner V, et al: Allelic repertoire of the human MHC class I MICA gene. *Immunogenetics* 1996;44:351-357.
- 17) Mizuki N, Ota M, Kimura M, et al: Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: A strong association of six GCT repetitions with Behcet disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:1298-303.
- 18) Ota M, Katsuyama Y, Mizuki N, et al: 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, Uygur, Kazakhstan, Iranian, Saudi, Arabian, Greek and Italian. *Tissue Antigens* 1997;49:448-54.
- 19) Katsuyama Y, Ota M, Ando H, et al: Sequencing based typing for genetic polymorphisms in exons 2, 3, and 4 of the MICA gene. *Tissue Antigens*, in press.
- 20) Garland CF, Lilienfeld AM, Mendeloff AI, Markowitz JA, Terrell KB, Garland FC: Incidence rates of ulcerative colitis and Crohn's disease in fifteen areas of the United States. *Gastroenterology* 1981;81:1115-24.

- 21) Sinclair TS, Brunt PW, Mowat NA: Nonspecific proctocolitis in northeastern Scotland: a community study. *Gastroenterology* 1983;85:1-11.
- 22) Stowe SP, Redmond SR, Stormont JM, et al: An epidemiologic study of inflammatory bowel disease in Rochester, New York. Hospital incidence. *Gastroenterology* 1990;98:104-10.
- 23) Probert CS, Jayanthi V, Pinder D, Wicks AC, Mayberry JF: Epidemiological study of ulcerative proctocolitis in Indian migrants and the indigenous population of Leicestershire. *Gut* 1992;33:687-693.
- 24) Shivanada S, Lennard-Jones J, Logan R, et al: The EC-IBD study Group. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: Is there a difference between north and south? Result of the European collaborative study on inflammatory bowel disease (EC-IBD). *Gut* 1996;39:690-697.
- 25) Krolewski AS, Warram JH, Rand LI, Kahn CR: Epidemiologic approach to the etiology of type I diabetes mellitus and its complications. *New Engl J Med.* 1987;26:1390-8.
- 26) Medeiros LJ, Greiner TC: Hodgkin's disease. *Cancer* 1995;75:357-369.
- 27) Somnier FE: Myasthenia gravis. Occurrence, failure in neuromuscular transmission, clinical implementation of anti-AChR antibodies, and therapeutic progress. *Dan Med Bull* 1996;43:1-10.
- 28) Calkins B, Mendeloff AI: The epidemiology of idiopathic inflammatory bowel disease. In: Kirsner JB, Shorter RG, ed. *Inflammatory bowel disease*. 4th ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1995:31-68.

厚生科学研究費補助金特定疾患対策研究事業

「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究」班

分担研究報告書

## 腸管上皮細胞における中鎖，長鎖脂肪酸の IL-8 産生に及ぼす影響について

分担研究者 馬場 忠雄 滋賀医科大学 第二内科 教授

研究要旨:[目的] クロウン病患者における栄養療法の効果発現の一つには脂肪の量が重要であるといわれているが、その機序については明らかにされていない。今回、我々は炭素鎖の異なる脂肪酸による腸管上皮の活性化の影響を解明するために、胎児腸管由来の培養細胞株である INTESTINE407 を用いて中鎖脂肪酸 (MCFA)、長鎖脂肪酸 (LCFA) の IL-8 産生に及ぼす影響について検討した。[方法] IL-8 の発現については蛋白レベルと mRNA レベルで解析した。転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化についてゲルシフト法で解析した。[結果] IL-8 の産生の増加はオクタン酸 (MCFA) の単独の添加ではみられなかったが、オレイン酸 (LCFA) 単独の添加で軽度増加した。IL-1 $\beta$  によって誘導された IL-8 産生は MCFA 5mM の添加により約 2.2 倍に、また TNF- $\alpha$  により誘導された IL-8 産生は 1.3 倍に増加した。一方 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  によって誘導された IL-8 産生は LCFA 5mM の添加ではそれぞれ約 4.1 倍と 1.8 倍に増加した。この増強作用は mRNA レベルでも認められた。ゲルシフト法では IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  による NF- $\kappa$ B の活性化は MCFA、LCFA により増強した。[総括] MCFA、LCFA はともに IL-8 産生を増強させ、NF- $\kappa$ B の活性化をおこしたが、その効果は LCFA でより強く認められた。クロウン病の栄養療法における脂肪添加はエネルギーソースとして MCT が LCT に比べて有用であることが示唆された。

### 共同研究者

高谷 宏樹, 安藤 朗, 荒木 克夫,  
辻川 知之, 藤山 佳秀

所属 滋賀医科大学 第二内科

### A. 研究目的

炎症性腸疾患、以下 IBD と略す、は腸管の慢性炎症であるか病態については不明なところが多い。クロウン病患者の栄養療法において投与すべき脂肪の種類と量については未だ定説はない。現在脂肪含有経腸栄養剤による栄養療法が試みられてきている。文献によると、低脂肪の経腸栄養は炎症を改善するが、高脂肪の経腸栄養は炎症を悪化させるという報告や、0.6-5% の脂肪を含有した低脂肪の経腸栄養が CD 患者の栄養療法に有効であったという報告もある。さらに、脂肪酸の C 鎖長の違いが栄養療法の効果に関与し、活動期 CD 患者において MCT 含有率の高い経腸栄養は炎症を悪化させないが、LCT 含有率の高い経腸栄養は炎症を悪化させたという報告もみられる。我々の教室においても、ラット TNBS 腸炎モデルにおいて LCT 含有経腸栄養剤が MCT 含有経腸栄養剤と比較して炎症を悪化させるという知見を得ている。しかし、この実験結果からは脂肪が腸管上皮の炎症を悪化させるメカニズムは不明であった。そこで、我々は脂

肪酸の違いが炎症のメカニズムを調節するか否かについて、腸管上皮培養細胞において、MCFA、LCFA 添加による IL-8 産生に及ぼす影響について検討した。

### B. 研究方法

細胞使用した細胞 (INTESTINE407) は ATCC より購入した。この細胞はヒト胎児腸管由来の培養細胞で *in vitro* において正常な腸管上皮のモデルとして使用される。

#### 脂肪酸ミセルの調製

MCFA、LCFA は以下に述べる Johnston と Borgstrom の方法でミセル化して使用した。LCFA としてオレイン酸 (C18:1)、MCFA としてオクタン酸 (C8:0) を使用した。ともに 20mM のミセル溶液を作成した。コントロールとして 20mM タウロコール酸をコントロールとした。

#### IL-8 の定量

細胞を 24 穴プレートで培養し、コントロール、LCFA、MCFA を単独、または IL-1 $\beta$  (10ng/ml)、TNF- $\alpha$  (10ng/ml) と共に添加して 12 時間培養して培養上清を採取し、市販の ELISA キットで IL-8 蛋白の定量を行った。

IL-8 mRNA の解析細胞を刺激後 5 時間後に total RNA を AGPC 法で抽出した。Total RNA 20  $\mu$ g を 65 度で 15 分間加温し、1% アガロース-ホルムアルデヒドゲル

で電気泳動し nylon membrane に転写し、80度で乾燥させた。プレハイブリダイゼーション後 32P でラベルした IL-8 プローブと DNA ラベリングキットを用いてハイブリダイズしフィルムに感光させた。

核蛋白の抽出と、ゲルシフト分析 < B R > INTES-TINE407 を刺激後 2 時間後に Dignam と Roeder の方法で核蛋白を抽出した。NF- $\kappa$ B のコンセンサスオリゴとしては (5':AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGC C) を用いた。5' 末端を T4 polynucleotide kinase と [ $\gamma$  32P]ATP でラベリングしプローブとして使用した。DNA-蛋白結合反応は以前より報告されている方法で行い 4% アクリルアミドゲルで泳動した。そのゲルをゲルドライヤーで乾燥しフィルムに感光した。Super sift は転写因子に対する抗体を RI を加える前に加えることで形成させた。また、結合の specificity をみるために RI ラベルしていない oligonucleotide を高濃度で添加して DNA-蛋白結合反応を行った。

### C. 研究結果

#### IL-8 の定量

MCFA の単独の添加では IL-8 分泌に対して影響を及ぼさないが、LCFA の単独の添加群では弱いながらも IL-8 産生を増加させた。また、IL-1 $\beta$  (10ng/ml) の添加で誘導された IL-8 の分泌に対して、MCFA, LCFA はそれぞれ 2.2 倍、4.1 倍に増強効果を示し、LCFA で有意に高かった。TNF- $\alpha$  (10ng/ml) の添加で誘導された IL-8 の分泌に対しては MCFA の添加は 1.3 倍とあまり影響を及ぼさなかったが、LCFA の添加では IL-8 の産生は 1.8 倍と有意に増強された (図 1)。

図 1 中鎖脂肪酸、長鎖脂肪酸添加による IL-8 の産生

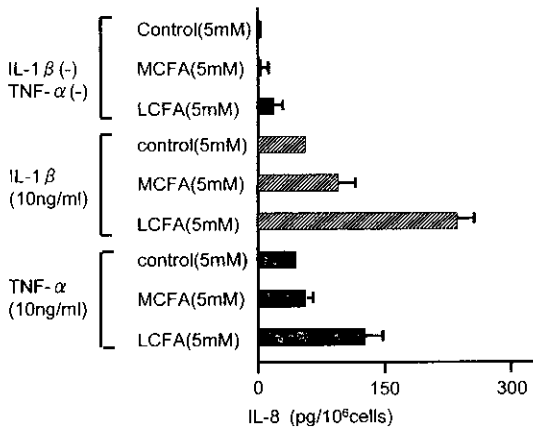
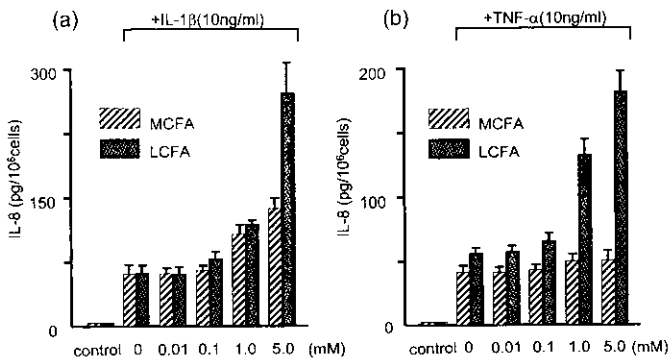


図 2 INTESTINE407 において IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  によって誘導された IL-8 産生に対する中鎖脂肪酸、長鎖脂肪酸の影響

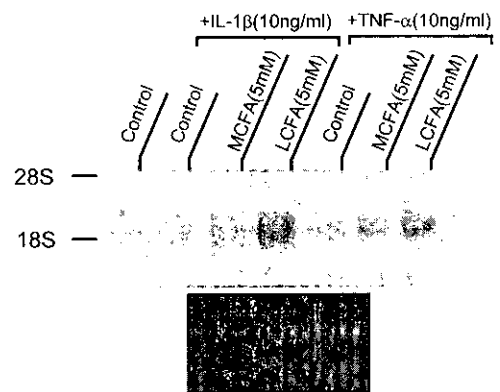


さらに IL-1 $\beta$  の添加で誘導された IL-8 の産生を MCFA, LCFA の添加は濃度依存性に増強させ、その効果は 0.1mM で現れた。TNF- $\alpha$  の添加で誘導した IL-8 の分泌に対して、LCFA は濃度依存性に増強させた (図 2a,b)。

#### 遺伝子発現の解析

LCFA, MCFA における IL-8 の産生について mRNA レベルで検討した。MCFA, LCFA の添加により IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  により誘導された IL-8 mRNA の発現を増強させた。その効果は LCFA に有意に強く、蛋白レベルの結果を反映していた (図 3)。

図 3 各種脂肪酸添加による IL-8 mRNA の発現



様々な遺伝子の発現において転写因子の活性化の重要性が報告されている。とりわけ、IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  の刺激に対しては NF- $\kappa$ B の活性化が重要視されている。こうしたことから、我々も脂肪酸による IL-8 産生に対するメカニズムを解明するため、INTESTINE407 において NF- $\kappa$ B の活性化について検討した。

IL-1 $\beta$  と TNF- $\alpha$  の添加後 1.5 時間後にレーン 2,5 に示すように NF- $\kappa$ B の活性化が誘導された。それらは MCFA (レーン 3,6), LCFA (レーン 4,7) の添加によってさらに増強された。また、LCFA は MCFA に比べて強く NF- $\kappa$ B の活性化を誘導した。結合の specificity をみるために非標識の NF- $\kappa$ B Oligo を添加したところ、band は消失している (レーン 8)。さらに、NF- $\kappa$ B の 50000MW に対する抗体 (p50) と 65000MW に対する抗体 (p65) を添加することで super shift band を形成した。このことから、活性化された NF- $\kappa$ B が p50 と p65 からなるヘテロダイマーであることが示された。これらの結果から、MCFA, LCFA による炎症のシグナル伝達が NF- $\kappa$ B 活性化を介していると考えられる (図 4)。

図 4 中鎖、長鎖脂肪酸による NF- $\kappa$ B の活性化

