

図4 ベーチェット病末梢血T細胞のPHA+PMA刺激に誘導されるサイトカイン産生

## 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

ベーチェット病における *CTLA-4* 遺伝子多型解析

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

ベーチェット病は、疾患発症の遺伝学的特徴から多因子性遺伝子疾患と考えられる。第6番染色体短腕上の *HLA-B51* 遺伝子はこれまでの研究から第一義的な疾患感受性遺伝子と思われるが、この領域以外にさらに疾患感受性遺伝子の存在が示唆される。今回は、抗原特異的な T 細胞反応を制御する細胞機能分子である *CTLA-4* (cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4) 遺伝子のエクソン1 遺伝子の多型 (A/G, Thr/Ala) とベーチェット病患者との相関を解析した。更に、*CTLA-4* 遺伝子近傍の5種類のマイクロサテライトを用いて相関解析を行った。その結果、マイクロサテライト解析では、患者群と有意に相関を示す対立遺伝子は検出されなかったが、*CTLA-4* のエクソン1の一塩基置換では (A to G)、患者群において G/A, G/G 遺伝子型が、対照群に比べ有意に増加していた (63% vs 39%, odds ratio=2.18,  $\chi^2=11.34$ ,  $p<0.0008$ )。

#### A. 研究目的

これまでの一連の研究結果からベーチェット病発症には、*HLA-B51* 遺伝子が、遺伝学的素因として強く関与していることを示してきた。しかし、*HLA-B51* 遺伝子のみでは、この疾患発症機序を説明することは困難であり、それ以外の遺伝子も疾患発症に関与している可能性が強く示唆される。ベーチェット病は、家族

内発症が非常に少なく、遺伝学的解析から、多因子性遺伝子疾患と考えられる。また、さらにこの疾患は自己免疫性疾患とも言われ、各種免疫担当細胞の活性異常も報告されている。抗原特異的な免疫反応では、抗原提示細胞である HLA 分子に結合した抗原ペプチドと TCR (T cell receptor) との反応が直接的に関与し、生体防御反応を行っているが、それに加え、

抗原特異的なT細胞反応を制御する細胞表面機能分子 (costimulatory molecules)が、T細胞の免疫反応惹起、終息に重要な役割を果たしている。このうち最も典型的な costimulatory 分子として CD28/CTLA-4 とそのリガンドである CD80(B7-1)、CD86(B7-2) 分子が知られている。そのなかでも CTLA4 分子は、活性化T細胞上に発現し、TCR シグナル依存性の細胞増殖抑制作用を行う。すなわち T 細胞が活性化されることにより、発現の亢進した CTLA-4 分子が CD80/CD86 分子と親和力を増し、それまで活性化に動いていた CD28 と CD80/CD86 の結合力を越えるようになる。さらに、CTLA4 シグナルが活性化を抑制するように作用してT細胞活性が治まり、同時に APC の活性化も終息に向かわせる機能が知られている。

今回この *CTLA4* 遺伝子のエクソン 1 領域内にある 49 番目の一塩基変異 (A to G) とベーチェット病との相関解析を行い、*CTLA-4* 遺伝子多型がベーチェット病発症に関わるかを検討した。あわせて、*CTLA-4* 遺伝子近傍に存在するマイクロサテライトを用いてベーチェット病疾患感受性遺伝子のゲノムマッピングを試みた。

## B. 研究方法

ベーチェット病患者からの 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 は多型性解析用としてデータベース作成のため蓄積したものを使用した。

*CTLA-4* 遺伝子エクソン 1 の(A/G, Thr/Ala)多型解析は、*CTLA-4* 遺伝子エクソン 1 部を PCR (表 1) で増幅し、増幅産物(328bp)を制限酵素 BbvI で処理後、12%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い切断断片を観察する PCR-RFLP 法を用いた。エクソン 1 部の 49 番目が G であれば、244bp と 84bp の断片が観察され、この位置が A であれば、PCR 産物は切断されなく 328bp バンドが観察される。

また、*CTLA-4* 遺伝子の近傍で、疾患と相関する遺伝子の有無を検討するために、*CTLA-4* 遺伝子を囲む 2.3 cM の範囲に存在する 5 種類のマイクロサテライト (図 1) を用いて疾患群と健常人群との相関解析を行った。多型解析は、ゲノム DNA を PCR で増幅後 (表 1)、ABI sequencer を用いたフラグメント解析でアルル決定を行った。

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。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

CTLA-4 は細胞障害性T細胞に特異的に発現される遺伝子としてクローニングされ、この分子は T 細胞の活性化の誘導、持続、終息に影響をおよぼしている。特に CTLA-4 分子は、通常の状態では休止期の APC(antigen presenting cell)上の CD80/CD86 分子と結合し、抑制シグナルを送ることにより T 細胞の活性化を押さえ、休止期の状態にしている。また、APC からの刺激により一旦活性化された T 細胞には、CTLA-4 シグナルが TCR シグナルの下流に抑制的に作用し、活性化された T 細胞の沈静化を行う。すなわち、CTLA-4 分子は、つねに T 細胞の活性化を抑制する作用をし、免疫反応では重要な役割を果たしていると示唆される。

これまで、*CTLA-4* 遺伝子内の多型は、TNF $\alpha$ 遺伝子のプロモーター領域-318 での(C/T)とエクソン1領域+49 での(A/G)の SNP、エクソン3部の(AT) $n$ の STR(short tandem repeat)多型が報告されている。今回これらの多型を示す部位のなかで、エクソン1領域にある(A/G)多型を PCR-RFLP 法を用いて調べた。その結果表2に示

したように、患者群では G/A, G/G 遺伝子型が、健常人対象群比べ有意に増加していた (63% vs 39%, odds ratio=2.18; 95%CI:1.4-3.5,  $\chi^2=11.34$ ,  $p<0.0008$ )。

*CTLA-4* 遺伝子は第2番染色体長腕2q33 に存在している。この遺伝子の近傍にあるマイクロサテライト (図1) を用いて、さらに疾患感受性遺伝子のゲノムマッピングを試みたところ、いずれのマイクロサテライトマーカーでも、患者群において有意に高い頻度を示すアリルは見られなかった (表2)。また、患者群のアリル頻度が対象群に比べ高い頻度を示した各ローカス (*CTLA4* エクソン1+49(G),D2S1391(120),D2S2392(276),D2S116(140),D2S2214(276),D2S2237(136)) での有意差の移行を調べると、図2に示すように、最も患者群と相関を示すのは、*CTLA-4* ローカスであった。

以上のことから、免疫反応に重要な機能をはたす costimulatory molecule である *CTLA4* 遺伝子の多型は、ベーチェット病発症の遺伝的素因の一つと考えられた。

### D. 結論

ベーチェット病患者では、T 細胞活性化、鎮静化に重要な機能を果たしている *CTLA4* 遺伝子のエクソン1の

49番目多型 (A/G) のGが有意に増加していた。この多型 (A/G) は非同義置換 (Thr/Ala) を伴うが、CTLA4分子の機能に直接関与しているかはいまのところ明らかでない。これまで、第6番染色体短腕上に存在するHLA-B51 遺伝子がベーチェット病発症の疾患感受性遺伝子と考えられてきたが、CTLA4 遺伝子も疾患感受性の候補遺伝子として考えられる。今後、CTLA4 遺伝子多型とベーチェット病患者の病態との関連性についてさらに検討する必要がある。また、さらに、多因子性疾患の側面からの解析として、ベーチェット病と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も必要である。

#### E. 研究発表

##### 論文発表

- 1) Mizuki N, Ota M, Yabuki K, Katsuyama Y, Ando H, Palimeris GD, Kaklamani E, Accorinti M, Pivetti-Pezzi P, Ohno S, Inoko H. Localization of the pathogenic gene of Behcet's disease by microsatellite analysis of three different populations. Invest Ophthalmol Vis Sci .41:3702-3708,2000.
- 2) Saito S, Ota S, Yamada E, Inoko H, Ota M, Allele frequencies and

haplotypic associations defined by allelic DNA typing at HLA class I and class II loci in the Japanese population. Tissue Antigen 56:522-529,2000.

- 3) Ota M, Barhram S, Katsuyama, Y et al.: On the MICA deleted-MICB null, HLA-B4801 haplotype. Tissue Antigens, 58:268-271, 2000.
- 4) 太田正穂、猪子英俊。Behcet 病原因遺伝子の免疫遺伝学的解析。神経内科、52:508-514,2000.

表1. 相関解析に用いた各ローカスのプライマー

ローカス	5'	3'	PCR 条件
CTLA-4	forward	CCACGGCTTCCTTTCTCGTA	94°C 2min → 30cycles:94°C 1min, 56°C 1min,72°C 1min → 72°C 5min
	reverse	AGTCTCACTCACCTTTGCAG	
D2S1391	forward	CTCACTGTCTGGATTTCTTTGG	95°C 15min → 35cycles:95°C 45sec, 56°C 45sec, 72°C 60sec → 72°C 15min
	reverse	TAAGGACAAGTTAAAAAAGCTGG	
D2S2392	forward	CAACTGAAATCACAAAACAA	95°C 15min → 35cycles:95°C 45sec, 56°C 45sec, 72°C 60sec → 72°C 15min
	reverse	TGTCCACCTGTAATGGTAAT	
D2S116	forward	CAATCTCCACAAGTTGCTCA	95°C 15min → 35cycles:95°C 45sec, 56°C 45sec, 72°C 60sec → 72°C 15min
	reverse	GGATAGATAATTTAGGAGTGGG	
D2S2214	forward	GTC TTGCCACAATCACCC	95°C 15min → 35cycles:95°C 45sec, 56°C 45sec, 72°C 60sec → 72°C 15min
	reverse	AGCAAACAGTTTGGAGACAT	
D2S2237	forward	CAGAAATGCCTGTCCTGTCCA	95°C 15min → 35cycles:95°C 45sec, 56°C 45sec, 72°C 60sec → 72°C 15min
	reverse	GGCAAGTTGGCTACCTGACC	

表2. CTLA-4とマイクロサテライトにおける患者群と健常人群の頻度

D2S1391

allele	patient		control		R.R.	$\chi^2$	P
	(+)	(-)	(+)	(-)			
112	1	57	0	96	5.03	1.666	0.197
116	3	55	2	94	2.56	1.098	0.295
120	25	33	30	66	1.67	2.213	0.137
124	45	13	79	17	0.74	0.510	0.475
126	1	57	0	96	5.03	1.666	0.197
128	21	37	40	56	0.79	0.451	0.502
132	5	53	8	88	1.04	0.004	0.950

D2S2392

allele	patient		control		R.R.	$\chi^2$	P
	(+)	(-)	(+)	(-)			
260	2	52	2	94	1.81	0.350	0.554
266	15	39	31	65	0.81	0.331	0.565
268	0	54	3	93	0.25	1.722	0.189
270	1	53	0	96	5.41	1.790	0.181
272	6	48	12	84	0.88	0.063	0.802
274	3	51	3	93	1.82	0.532	0.466
276	21	33	32	64	1.27	0.467	0.494
278	10	44	18	78	0.98	0.001	0.972
280	7	47	6	90	2.23	1.968	0.161
282	12	42	19	77	1.16	0.125	0.724
284	14	40	25	71	0.99	0.000	0.988
286	7	47	22	74	0.50	2.196	0.138
288	2	52	9	87	0.37	1.636	0.201
290	1	53	0	96	5.41	1.790	0.181
292	0	54	1	95	0.58	0.566	0.452

D2S116

allele	patient		control		R.R.	$\chi^2$	P
	(+)	(-)	(+)	(-)			
134	28	32	48	48	0.88	0.164	0.685
136	12	48	22	74	0.84	0.184	0.668
138	7	53	22	74	0.44	3.088	0.079
140	17	43	22	74	1.33	0.578	0.447
142	27	33	40	56	1.15	0.167	0.682
144	14	46	21	75	1.09	0.045	0.832
146	2	58	2	94	1.62	0.231	0.631
148	1	59	1	95	1.61	0.114	0.736
150	0	60	1	95	0.53	0.629	0.428
152	0	60	1	95	0.53	0.629	0.428

**D2S2214**

allele	patient		control		R.R.	χ <sup>2</sup>	P
	(+)	(-)	(+)	(-)			
272	0	60	1	95	0.53	0.629	0.428
274	2	58	2	94	1.62	0.231	0.631
276	22	38	25	71	1.64	1.980	0.159
278	57	3	88	8	1.73	0.626	0.429
280	3	57	4	92	1.21	0.060	0.807
282	1	59	0	96	4.87	1.610	0.204
286	3	57	8	88	0.58	0.626	0.429

**CTLA-4 49A/G**

allele	patient		control		R.R.	χ <sup>2</sup>	P
	(+)	(-)	(+)	(-)			
G	58	7	66	27	3.39	7.556	0.006
A	47	18	86	7	0.21	11.681	0.001

**CTLA-4 49A/G(Genotype)**

allele	patient		control		R.R.	χ <sup>2</sup>	P
	(+)	(-)	(+)	(-)			
G	76	54	73	113	2.18	11.337	0.0008
A	54	76	113	73	0.46	11.337	0.0008

**D2S2237**

allele	patient		control		R.R.	χ <sup>2</sup>	P
	(+)	(-)	(+)	(-)			
124	7	53	20	75	0.50	2.252	0.13343193
126	6	54	10	85	0.94	0.011	0.91645386
128	10	50	17	78	0.92	0.039	0.84433315
132	4	56	5	90	1.29	0.132	0.71590849
134	0	60	1	94	0.00	0.636	0.42527944
136	52	8	80	15	1.22	0.176	0.67522209
138	9	51	10	85	1.50	0.684	0.40811095
140	6	54	6	89	1.65	0.699	0.40317353
142	0	60	2	93	0.00	1.280	0.25796062
144	0	60	1	94	0.00	0.636	0.42527944



図1. CTLA4遺伝子と近傍のマイクロサテライト

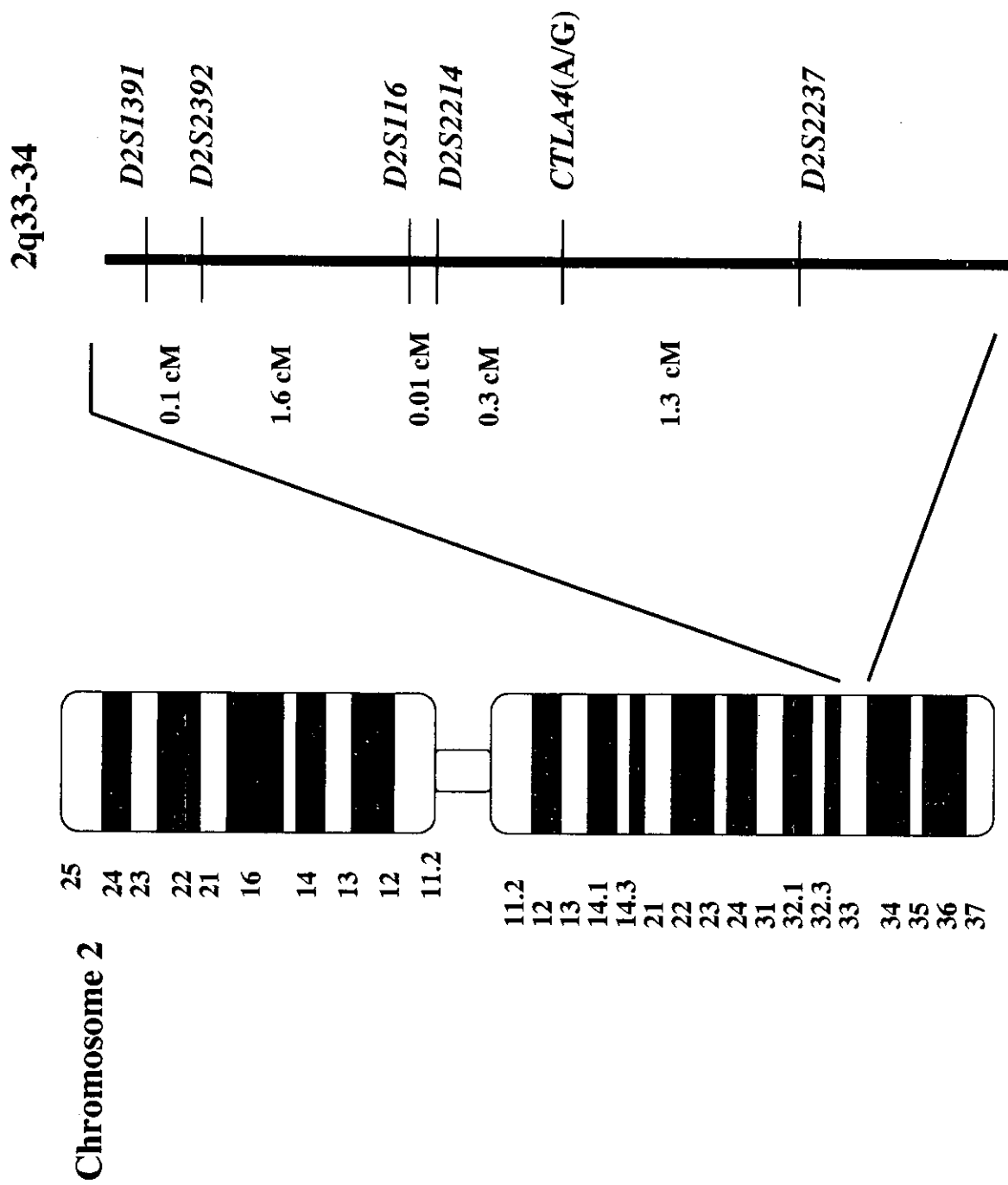
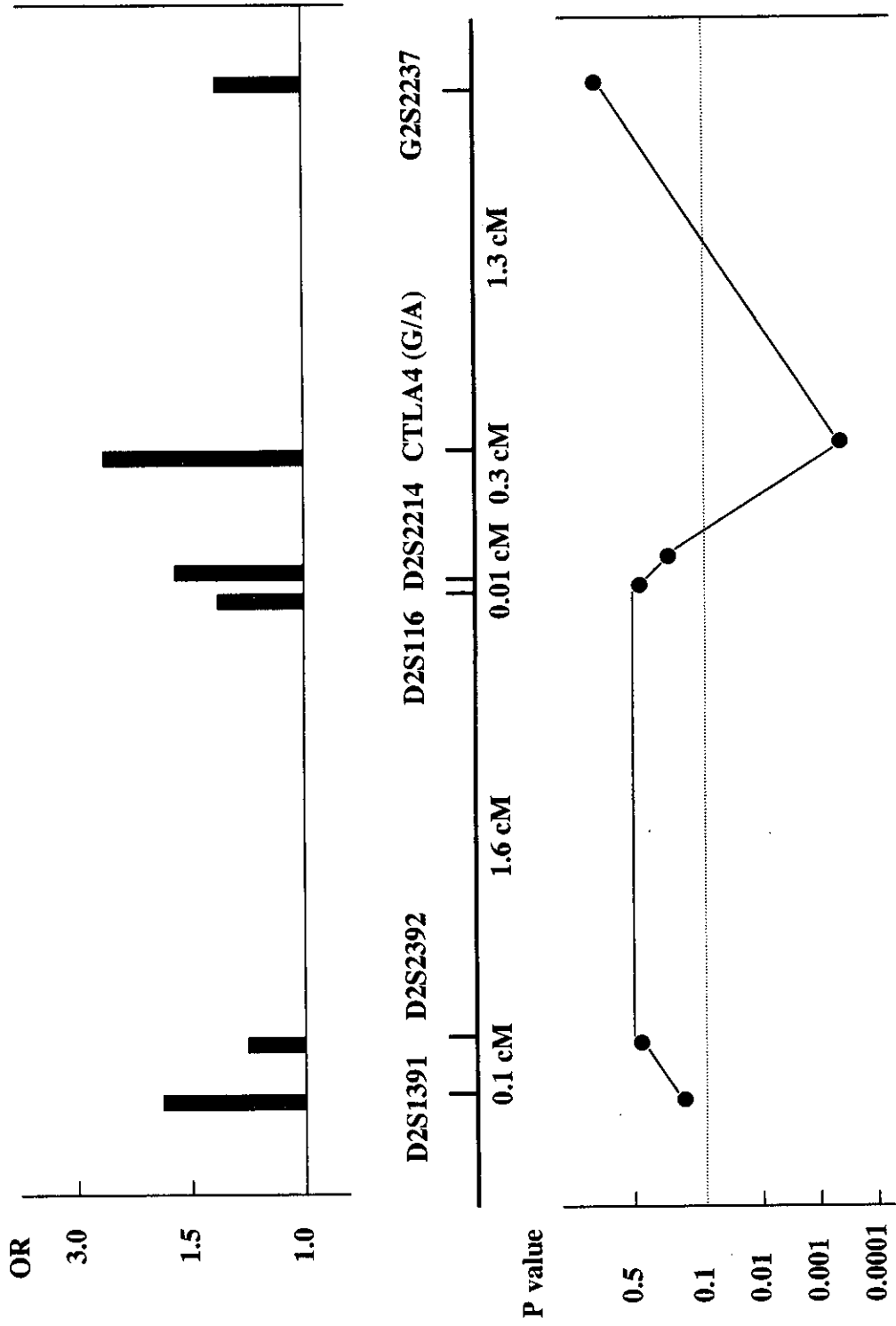


図2 バーチェット病とマイクロサテライトとの相関



## *Streptococcus sanguis* と分子相同性を示す網膜抗原および熱ショック蛋白合成ペプチドに対するベーチェット病患者における抗体応答の相関

分担研究者 磯貝恵美子  
磯貝 浩  
石原麻美  
小熊恵二  
横田憲治  
小竹 聡  
大野重昭

北海道医療大学口腔衛生  
札幌医科大学実験動物  
横浜市大眼科  
岡山大細菌  
岡山大細菌  
北大院病態制御学感覚器病  
北大院病態制御学感覚器病

### 研究要旨

ベーチェット病の外因の候補として、*Streptococcus sanguis* が関与することを報告してきた。我々は本病のモデル動物として、無菌マウスに *S. sanguis* を接種し、コッホの 4 原則を満足しうるモデルを作成した。このモデルにおいて、接種菌数に依存してヒト熱ショック蛋白 (hHSP) 合成ペプチドに対する応答が見られた。そこで、hHSP 合成ペプチドに対する抗体応答と網膜抗原関連ペプチドとの相関を調べた。ついで、実際の患者血清を用いて、坂根らや Lehner らが報告したペプチド領域と網膜抗原共通領域に対する応答の相関を調べた。

hHSP 合成ペプチドとしては hHSP (QPHDLGKVGIVTKDD, 336-351) および *S. sanguis* と網膜抗原共通領域に関するペプチド 4 種を用いた。抗体価の測定は ELISA によった。

感染マウス IgG 抗体価測定において、hHSP と相関を示したペプチドは Brn-3b (AFSMPHGGSLHVEPK, 11-25) と Bes-1 (AFIVPHCGGHFHYIPK, 229-243) であった。しかし、対象マウスにおいて、相関を示すものはなかった。

ヒト血清を用いた場合、IgG 抗体価は hHSP ペプチドと *S. sanguis*-網膜抗原共通領域ペプチドとの間に相関が見られた。IgM では用いたペプチドによって相関を示すものとそうでないものが存在した。IgA 抗体価ではそれぞれのペプチドに対する抗体価の相関はなかった。また、IgG, IgM, IgA の相互の間に相関は見られなかった。このような相関のパターンは眼症状を有するアレルギー患者や健康成人とは異なっていた。

### A. 研究目的

ベーチェット病 (BD) は再発性の口腔および外圍陰部の潰瘍、ブドウ膜炎を伴う全身の炎症性疾患である。その病因と発病病理機構はいまだ不明とされている。我々は *Streptococcus sanguis* が外因の候補であることを示してきた (3, 4, 5, 7, 8, 9)。たとえば、口腔細菌叢に占める *S. sanguis* の割合は対照に比較して有意

に増加していた (4)。さらに、患者からの分離株は遺伝的、抗原的、生物学的性状をこれまで報告された標準株と異にしていた (8)。患者病状の活動性のめやすとなる好中球の活性化のレベルは口腔内の *S. sanguis* の増加に相関していた (4)。臨床分離株から得た抗原に対しての患者の免疫応答は抗体応答や皮膚反応などで証明されただけでなく、場合によって

は症状の誘発も起こしえた(7)。*S. sanguis*と共通領域のhHSPペプチドはBD患者の $\gamma\delta$ -T細胞応答を誘導することが報告されている(1)。そこで、実験動物モデルおよびヒトにおけるhHSP合成ペプチドと網膜抗原関連ペプチドに対するそれぞれの抗体価の相関を調べた。

## B. 研究方法

hHSP合成ペプチドとしてはhHSP(QPHDLGKVGIVTKDD, 336-351)および*S. sanguis*と網膜抗原共通領域に関するペプチド4種を用いた(表1)。抗体価の測定はELISAによった。ヒト血清としては眼症状を有するBD患者、アレルギー患者、アデノウイルス感染患者血清を用いた。対照としては年齢および性別をマッチさせた健康成人の血清を用いた。感染マウスモデルについては無菌I Q Iマウスに患者由来菌株BD113-20を口腔に $10^{3.5, 7}$ の菌を接種し、感染成立後の抗体価を調べた。

## C. 研究結果

各ペプチドに対する抗体価をBD患者群、疾患対照群(アデノウイルス性ブドウ膜炎、アレルギー性ブドウ膜炎)、健康成人群で比較した。IgG抗体価はBD患者群でNo.1、No.2およびNo.3ペプチドに対して有意に高かった(図1)。hHSPに対するIgG抗体価の平均では有意差が認められなかった。しかし、抗体価の分布パターンは健康成人とは異なり、2峰性であった(図2)。さらに、hHSPペプチドと*S. sanguis*-網膜抗原共通領域ペプチドそれぞれに対するIgG

抗体価はすべての組み合わせで相関を示した(表2)。IgM抗体価ではBD患者群と疾患対照および健康成人群との間に有意差を認めなかった。IgMでは用いたペプチドによって相関を示すものとそうでないものが存在した。すなわち、hHSP、No.2、No.3、No.4の間には強い相関があるにもかかわらず、No.1はどのペプチドとの組み合わせでも低い相関係数であった。IgA抗体価はHSPに対する抗体価のみBD患者群で有意に高かったが、それぞれのペプチドに対する抗体価の相関はなかった。また、IgG、IgM、IgAの相互の間に相関は見られなかった。相関のパターンは眼症状を有するアレルギー患者(表3)や健康成人(表4)では認められなかった。

*S. sanguis*はマウスの口腔に定着し、眼病変として虹彩毛様体炎を起こした。網膜抗原関連ペプチドおよび熱ショック蛋白合成ペプチドに対して抗体応答が成立した。抗体価は未感染対照マウスと比較したとき、有意に高かった。感染マウスIgG抗体価測定において、hHSPと相関を示したペプチドはNo.1(Brn-3b)とNo.2(Bes-1)であった(表5)。しかし、対象マウスにおいて、相関を示すものはなかった。

## D. 考察

本実験に用いた実験モデルは微生物をいっさい持たない無菌マウスに*S. sanguis*を感染させたものである。感染は容易に成立し、局所だけでなく全身への免疫応答誘導の証明ができた。このモデルでは本病のもっとも重要な症状である眼病変について感染後2週間目という短期間のなかで虹彩毛様体炎を証明できている。HSPや網

膜抗原ペプチドに対する抗体誘導が起こり、それぞれのペプチドに対する抗体応答に相関が見られた。このことは、分子相同性を示す細菌と宿主の共通抗原領域が発症に関与することを示唆している。しかし、病変そのものは軽度であり、遺伝的背景が重症化や疾病の持続に関与するのかもしれない。

実験に用いた抗原ペプチドに対する抗体価は有意に高く、相互に相関を示した。特に IgG 抗体価について、すべての組み合わせで相関が見られたことは興味深い。患者血清に対して、高い反応性を示す 95 kD 蛋白の一部をコードしている B e s - 1 は網膜抗原をコードしている遺伝子と高い相同性を有している (10)。熱ショック蛋白についても人と細菌間での分子相同性と病態形成への関与が示唆されてきた (11,12)。H s p は様々の自己免疫疾患の発病病理に関与することが示されてきた。実際、H s p 特異的な抗体産生や T 細胞応答、さらに病変部位に H s p の過剰発現が認められている。本実験と同じシーケンスの hHSP を皮下免疫されたラットでは高率にブドウ膜炎が誘導されるという報告がある (2)。しかし、H s p のみではそれぞれの疾病の特性を説明できない。複数の関連分子によって、ベーチェット病特有の病変が形成されるのかもしれない。

ベーチェット病の診断基準の項目は皮膚、粘膜および眼症状などの臨床所見によるものである。しかし、この中には類似の症状を呈する多くの疾患がある。実験に用いた抗原ペプチドはベーチェット病患者では相互に相関を示すことから、人での鑑別診断の補助に応用できる可能性を示した。健康成人や他の類症鑑別を必要とす

る疾患ではどれかのペプチドに対する高い抗体価がえられても関連のない分子では相互の相関を認めない。さらに応用範囲を考えると、炎症の活動性や重症度判定、治療効果判定にも使用できるかもしれない。血清抗体価測定は誰もが簡単にでき、かつ過去の保存血清についても対応できる特性がある。カットオフ値を考慮して、ペプチド抗原を組み合わせた単純なラテックス凝集反応やドットプロットなどのアッセイ系を確立は今後の課題として検討したい。

## E. 結論

- 1) BD 患者では網膜抗原関連ペプチドおよび H s p に対して高い抗体価を認めた。I g G 抗体価は h H S P ペプチドと *S. sanguis*-網膜抗原共通領域ペプチドとの間に相関が見られた。I g M では用いたペプチドによって相関を示すものとそうでないものが存在した。I g A 抗体価ではそれぞれのペプチドに対する抗体価の相関はなかった。また、I g G, I g M, I g A の相互の間に相関は見られなかった。このような相関のパターンは眼症状を有するアレルギー患者や健康成人とは異なっていた。
- 2) *S. sanguis* を無菌マウスに定着させることによって、BD と類似の病変を誘導できた。これらマウスでは網膜抗原関連ペプチドおよび h H s p に対して抗体応答が成立しただけでなく、それぞれのペプチドに対する抗体価に相関を示した。

## F.引用文献

1. Hasan, A. et al. 1996. *Lancet*. 347, 789-784.
2. Hu, W. et al. 1998. *Eur. J. Immunol.* 28, 2444-2455.
3. Isogai, E., et al. 1991. *Arch. Oral Biol.* 36: 425-429.
4. Isogai, E., et al. 1990. *Arch. Oral Biol.* 35: 43-48.
5. Isogai, E. et al. 1990. *Bifidobacteria Microflora* 9: 27-41.
6. Sakane, T. et al. 1999. *New Engl. J. Med.* 341: 1284-1291.
7. The Behcet's Disease Research Committee of Japan. 1989. *J. Rheumatol.* 16:506-511
8. Yokota, K., et al. 1995. *Microbiol. Immunol.* 39: 729-732.
9. Yokota, K., et al. 1992. *Microbiol. Immunol.* 36: 815-822.
10. Yoshikawa, et al. 1998. *Zentbl. Bakteriologie* 287, 449-460
11. Kaneko, S. et al. 1997. *Clin. Exp. Immunol.* 108: 204-212.
12. Lehner, T. et al. 1991. *Infect. Immun.* 59: 1434-1441.

表 1. 使用した合成ペプチドのアミノ酸シーケンス

Synthetic peptide	Peptide sequence
Human Hsp 60-kD ( <i>hsp336-351</i> )	QPHDLGKVGIVTKDD
<i>S. sanguis</i> protein 95-kD ( <i>BeS-1</i> , 229-243, No.2)	AFIVPHGGHFHYIPK
<i>S. sanguis</i> protein 95-kD ( <i>BeS-1</i> , 373-385, No.3)	HGDHHHFIPYDKL
Retinal ganglion cells ( <i>Brn-3b</i> , 11-25, No.1)	AFSMPHGGSLHVEPK
Retinal ganglion cells ( <i>Brn-3b</i> , 177-189, No.4)	HHHHHHHQPHQAL

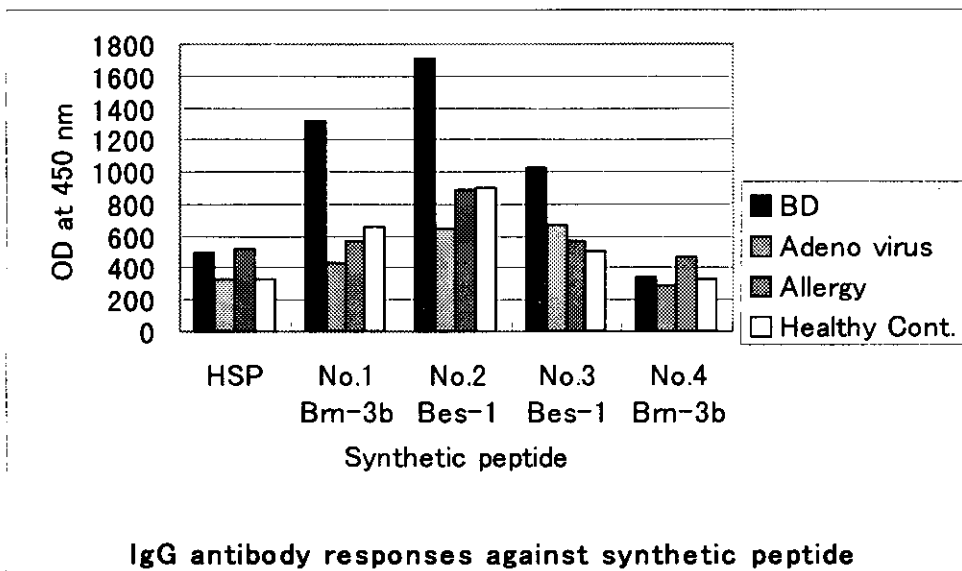


図 1 各種合成ペプチドに対する IgG 抗体価

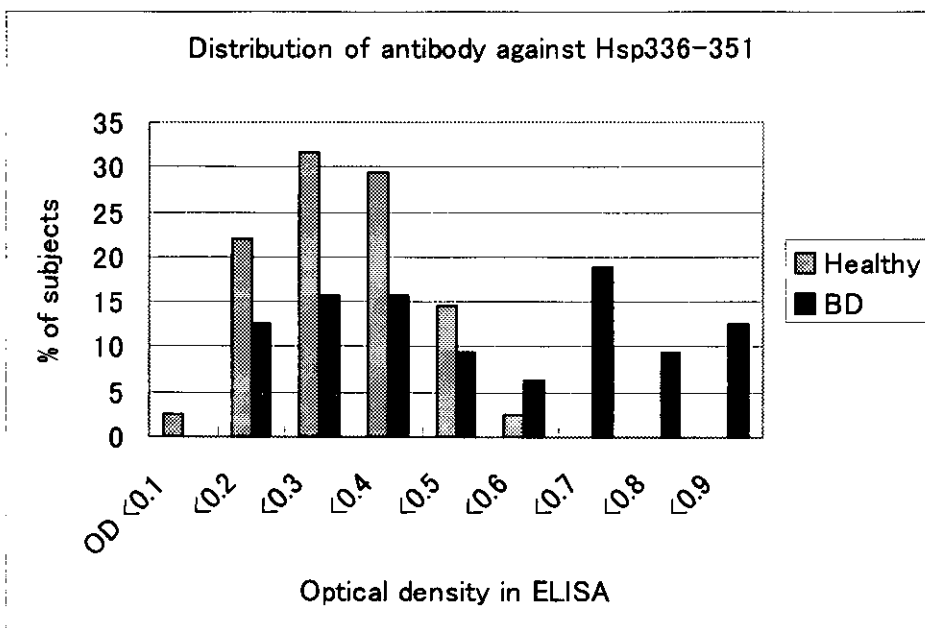


図 2. hHSP に対する抗体価の分布に比較

表2. ベーチェット病患者における各種合成ペプチドに対する IgG 抗体価の相関

	IgG 抗体価の相関係数				
	HSP	No.1 (Brn-3b)	No.2 (Bes-1)	No.3 (Bes-1)	No.4 (Brn-3b)
HSP	1.000				
No.1	0.570	1.000			
No.2	0.704	0.652	1.000		
No.3	0.581	0.680	0.724	1.000	
No.4	0.706	0.586	0.622	0.861	1.000

表3. アレルギー患者における各種合成ペプチドに対する IgG 抗体価の相関

	IgG 抗体価の相関係数				
	HSP	No.1 (Brn-3b)	No.2 (Bes-1)	No.3 (Bes-1)	No.4 (Brn-3b)
HSP	1.000				
No.1	-0.120	1.000			
No.2	-0.217	0.184	1.000		
No.3	0.130	-0.179	-0.049	1.000	
No.4	0.142	-0.042	-0.056	0.135	1.000

表4. 健康成人における各種合成ペプチドに対する IgG 抗体価の相関

	IgG 抗体価の相関係数				
	HSP	No.1 (Brn-3b)	No.2 (Bes-1)	No.3 (Bes-1)	No.4 (Brn-3b)
HSP	1.000				
No.1	0.139	1.000			
No.2	0.148	0.130	1.000		
No.3	0.229	0.102	0.131	1.000	
No.4	0.142	0.037	-0.189	0.032	1.000



## ペーチェット病患者由来 *Streptococcus sanguis* から抽出される 新規糖脂質の探索

分担研究者	磯貝恵美子	北海道医療大学口腔衛生
	松尾幸毅	北大院地球環境環境分子生物
	荒木義雄	北大院地球環境環境分子生物
	磯貝 浩	札幌医科大学実験動物
	金子史男	福島県立医大皮膚科
	大野重昭	北大院病態制御学感覚器病

### 研究要旨

V $\alpha$ NKT 細胞は唯一の抗原受容体を発現する新しいリンパ球であり、そのリガンドは糖脂質 $\alpha$ ガラクトシルセラミド (Gal-Cer) であることが報告された。このリガンドは NKT を特異的に活性化することが知られている。このようなセレブシドはある種の細菌に存在している。Gal-Cer は存在するのか、あるいは他の何らかの活性を有する糖脂質を単離できるのか-ペーチェット病患者由来 *Streptococcus sanguis* からの抽出、精製を試みた。

抽出は洗浄菌体を超音波破碎後、クロロフォルム-メタノール (2 : 1) で行った。クロロフォルム層へ移行したサンプルを TLC で展開し、オルシノール硫酸法で検出した。サンプルの中には Gal-Cer をはじめとし、グルコシルセラミドやラクトシルセラミドは検出できなかった。このことはサンプルをアルカリで処理すると分解されることから、明らかである。オルシノール硫酸で検出される成分は 3 成分であり、グリセロ糖脂質である可能性が高い。全血をもちいて好中球の化学発光を調べたところ、菌体細胞壁は持続的な発光パターンを示すのに対して、*S. sanguis* 由来の糖脂質はオリーブオイル (基材) による一過性の初期発光を抑制した。

### A. 研究目的

NKT 細胞は NK 細胞の性質を併せ持つ T 細胞のサブセットのひとつである (1)。NKT 細胞は自己免疫の抑制から腫瘍の拒絶にいたるまで幅広い活性を有し、ヘテロな細胞集団として注目されている。NKT 細胞はその Invariant な T 細胞レセプターを用いて、MHC クラス IIb 分子のひとつで多型

を欠く CD1 分子に提示される特定の糖脂質を抗原として認識される。ヒト CD1 b、c に提示されることが報告された結核菌由来リボアラビノマンナン、ミコール酸、マウス CD1 に提示されることが報告された $\alpha$ ガラクトシルセラミドは TCR 認識に関与する親水性部位 (糖鎖) と CD1 groove に埋め込まれる疎水性部位 (脂質) をもつ両媒

体性物質である。このような抗原は結核菌や緑膿菌などの細菌に存在している。*S. sanguis*の細胞壁は水に難溶性で糖脂質を混在させている可能性がある。また、その分析結果を見るとガラクトースとグルコースが主要な糖として検出されている(2)。ペーチェット病患者由来 *S. sanguis* に Gal-Cer は存在するのか、あるいは他の何らかの活性を有する糖脂質を単離できるのか-本菌からの糖脂質の抽出、精製を試みた。

## B. 研究方法

抽出精製法を図1に示した。すなわち、抽出は洗浄菌体を超音波破碎後、クロロフォルム-メタノール(2:1)で行った。クロロフォルム層へ移行したサンプルをTLCで展開し、オルシノール硫酸法で検出した。

抽出された糖脂質の活性を調べるために、滅菌オリーブオイルにサンプルを溶解した。これを刺激剤として健康成人の血液を用いて全血化学発光(3)を行った。陽性対照としては細胞壁を用いた。

## C. 研究結果

$\alpha$ ガラクトシルセラミドをはじめとするスフィンゴ脂質は抽出できなかった。しかし、3つの主要糖脂質が存在することがわかった(図2)。しかし、サンプル中にはGal-Cerをはじめとし、グルコシルセラミドやラクトシルセラミドは検出できなかった。このことはサンプルをアルカリで処理すると分解されることから、明らかで

ある。オルシノール硫酸で検出される成分は3成分であり、グリセロ糖脂質である可能性が高い。

全血をもちいて好中球の化学発光を調べたところ、菌体細胞壁は持続的な発光パターンを示すのに対して、*S. sanguis*由来の糖脂質はオリーブオイル(基材)による一過性の初期発光を抑制した。この反応抑制は濃度依存性だった。

## D. 考察

本実験において、 $\alpha$ ガラクトシルセラミドをはじめとするスフィンゴ脂質は抽出できなかったが、3つの主要糖脂質を単離できた。親水性部位(糖鎖)と疎水性部位(脂質)をもつ両媒体性物質については、ターゲットとしたスフィンゴ脂質や結核菌由来のりポアラビノマンナン、ミコール酸などが知られている。一般に、グラム陽性球菌の細胞表層には非蛋白性リガンドとして、りポタイコ酸(LTA)や糖脂質ポリマーが存在している(4)。LTAは膜の糖脂質にホスホジエステル結合しており、結合ユニットはglycerophosphateである。今回得られた主要糖脂質はこのような細胞壁の構造に関連したものであろう。

細菌の菌体を構成するものは多くの生物活性を有する。たとえば、りポ多糖やLTAはその代表である。今回得られた糖脂質がどのような生物活性をもつのかはほとんどわからないが、病態に関連する活性をもつかもしいない。化学発光の抑制は好中球の機能抑

制の結果と考えられる。このことは一見ベーチェット病における好中球の過剰反応と矛盾する。しかし、抑制反応の解除に伴う免疫異常がおこることなども考えられる。

#### E. 結論

$\alpha$ ガラクトシルセラミドをはじめとするスフィンゴ脂質は抽出できなかった。しかし、3つの主要糖脂質が存在することがわかった。

#### F. 引用文献

- 1 . Godfrey, D. I. et al. Immunology Today, 2000,21: 573-583
- 2 . Yokota,K. et al. Microbiol. Immunol. 1995,39:729-732
- 3 .Isogai, E. et al. Archs Oral Biol. 1990, 35: 43-48
- 4 . Fischetti, V. A. et al. Gram-Positive Pathogen, 2000, CD-ROM Multimedia version, American Society for Microbiology

*S. sanguis* BD113-20 cells

↓生理食塩水で洗浄

↓9000×g, 15 min

pel.

↓オートクレーブ (120°C、30 min)

↓脱イオン水に懸濁

↓超音波破碎

↓凍結乾燥

↓クロロホルム-メタノール (2 : 1)

↓室温で8時間攪拌

↓9000×g, 15 min

sup. (pel.はクロロホルム-メタノールで再抽出)

↓乾燥

↓クロロホルム-水で分配

クロロホルム相

↓乾燥

M5-18

M5-18 を TLC に供しその中の成分を精製

TLC plate: HPTLC aluminium sheets silica gel 60 (Merck)

展開溶媒: クロロホルム : メタノール : 水 = 60 : 35 : 8

検出: オルシノール-硫酸法

3種類の成分が検出され、各成分をシリカゲルごと回収

↓クロロホルム : メタノール : 水 = 10 : 10 : 1

↓超音波破碎

↓3000 rpm, 15 min

sup.

↓水

↓3000 rpm, 15 min

有機溶媒相

↓乾燥

↓クロロホルムに溶解

↓ろ過

sup.

↓乾燥

M5-24 (1), (2), (3)

図1. 糖脂質の抽出精製法