

Immunogenetics and uveitis, Ophthalmology. in press.

54. Ikewaki N, Inoko H : International Human Leukocyte differentiation Workshop Report (CAM-section),

55. Mizuki N, Inoko H, Ohno S : Molecular genetics (HLA) of Behcet's disease.

56. Mizuki N, Inoko H : Behcet's disease: Immunogenetics. "Vasculitis" Diagnosis, Course and Treatment of Vasculitis Syndromes

学会発表

1. 猪子英俊：マイクロサテライトを用いた疾患遺伝子のマッピングの戦略、ゲノムシンポジウム、2001.
2. 猪子英俊：HLAは何故多くの疾患発症に関わるのか？、第100回日本皮膚科学会総会教育講演、2001.
3. 猪子英俊：ゲノムワイドな疾患のマッピング戦略-マイクロサテライトを用いて、第197回DNA研究会、2001.
4. 猪子英俊：マイクロサテライトを用いたゲノムワイドな疾患遺伝子マッピングの戦略：HLAモデル領域として、第1回G1(gastrointestinal)リサーチフォーラム、2001.
5. 猪子英俊：疾患関連遺伝子同定の戦略 -HLA領域をモデルとして-、第8回日本遺伝子診療学会

大会 シンポジウム「ゲノムの個性と疾患」、2001.

6. 猪子英俊：疾患関連遺伝子同定の戦略 -HLA領域をモデルとして-、山之内製薬セミナー

7. 猪子英俊：疾患関連遺伝子同定の戦略 -HLA領域をモデルとして-、湧永製薬セミナー

8. 猪子英俊：HLAと関連する疾患の感受性遺伝子の探索、臨床HLA研究会セミナー

9. 猪子英俊：MICとCD1遺伝子領域のゲノム構造、第10回日本組織適合性学会 シンポジウム「Non-classical MHC」、2001.

10. 猪子英俊：マイクロサテライト多型を用いたHLAと関連する疾患の遺伝子マッピングと同定、第10回日本組織適合性学会 シンポジウム「多因子疾患の遺伝的要因としてのHLA」、2001.

11. 猪子英俊：ポストゲノムシーケンシング解析のモデル領域としてのMHC -ゲノム多様性解析と比較ゲノム解析-、第10回日本組織適合性学会 シンポジウム「MHC-総合ゲノム科学の視点から」、2001.

12. 猪子英俊：箱根山シンポジウム”多因子疾患の遺伝子解析：遺伝子同定から臨床応用へ”、2001.

13. 猪子英俊：複合疾患関連遺伝子の

マイクロサテライトを用いたゲノム
ワイドなマッピングの戦略、第9回
難病治療研究会、2001

markers. Genomics and Phenomics of
Vasculitis and Atherosclerosis, 2001.

14. 猪子英俊：マイクロサテライトを
用いたゲノムワイドな相関解析によ
る疾患遺伝子のマッピング、第40
回長崎大学大学院特別セミナー、2001

15. Inoko H : Strategy for genome-wide
mapping of common diseases using
association analysis with microsatellites.
Genome Science in the 1st Century ;
Information of the Higher-Order
Structure beyond the Primary Sequence,
2001.

16. H Inoko, T Anzai, Y Fukuzumi, M
Yamazaki, H Tashiro, JK Kulski, T
Shiina: Genome sequencing and
comparative genome analysis on the
chimpanzee MHC class I region.
GEMINI Workshop on Ape Genomics,
2001.

17. H Inoko : Comparative genomics on
the MHCs by genome sequencing.
Symposium on Evolution Genomics,
2001

18. Inoko H : Genome-wide scan of
disease genes by association analysis
using microsatellites. The 1st Hakone-
yama Symposium, "Genetic analysis of
Multifactorial Diseases" 2001

19. Inoko H : Genome-wide scanning of
disease-susceptible loci by microsatellite

『ベーチェット病における MICA アリル解析』

分担研究者 水木 信久

〔研究要旨〕

トルコ人およびイラン人のベーチェット病患者人を対象として、PCR-SBT 法により、MICA 遺伝子タイピングを行い、HLA-B 遺伝子との連鎖解析を行った。その結果、MICA009 アリルが両民族患者群で有意に増加していたが、これは HLA-B51 との連鎖によるものであると考えられた。したがって、本病の主要な疾患感受性遺伝子は HLA-B51 抗原遺伝子である可能性が高いと考えられた。

分担研究者 水木信久¹⁾ 太田正穂²⁾ 勝山善彦³⁾ 尾本 周¹⁾ 矢吹和郎¹⁾ 山根敬浩¹⁾ 安藤 等⁴⁾ 猪子英俊⁴⁾

1) 横浜市立大学医学部眼科

2) 信州大学医学部法医 3) 信州大学医学部薬剤部

4) 東海大学医学部分子生命科学

〔研究目的〕

以前われわれは、日本人の本病患者を対象として MICA 遺伝子解析を行い、本病の原因遺伝子は MICA 遺伝子ではなく、HLA-B 遺伝子であり、主要な疾患感受性遺伝子は HLA-B51 である可能性が高いことを報告してきた。異なる民族においても同様の相関が得られるか否かを検討するため、今回われわれは対象をトルコ人およびイラン人本病患者群を対象として MICA 遺伝子解析を行い、健康対照群と比較検討した。

〔研究方法〕

トルコ人の本病患者群 41 人、健康対照群 74 人およびイラン人の本病患者群 76 人、健康対照群 75 人について解析した。

MICA 遺伝子第 2、3、4、5 エクソン領域を挟むプライマー（5'primer: ATT TCC

TGC CCC AGG AAG GTT GG ; 3'primer CTA CTG CCC AGA CAG GGG CCT TA) をデザインし PCR (polymerase chain reaction) 法にて特異的に増幅した (PCR 産物 : 2073bp)。PCR 産物を MICROCON100 (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した。各エクソンのシーケンシングプライマーは下記の通りである。

(exon 2 ; Forward-2 : ATT TCC TGC CCC AGG AAG GTT GG, Reverse-2 : GTG CCG GCT CAC CTC CCC TGC T), (exon 3 ; Forward-3 : GTG AGG AAT GGG GGT CAG TGG AA, Reverse-3 : CAA CTC TAG CAG CAG AAT TGG AGG GAG), and (exon 4 ; Forward-4 : AAG AGA AAC AGC CCT GTT CCT CTC C, Reverse-4 : TCC CTG CTG TCC CTA CCC TG)。塩基配列データを ABI Factura software (PE Biosystems) にて解析後、ヘテロ部位の検出には ABI Sequence Navigator Program (PE Biosystems) を用いた。これらの塩基配列データを既知の 47 種類の MICA 対立遺伝子 (アリル) と比較する

ことにより、その遺伝子タイプを決定した。

統計学的検定は、 χ^2 乗値および Fisher の直接法による P 値検定を行った。MICA 遺伝子と HLA-B 遺伝子間の連鎖解析は、Mantel-Haenszel の weighted odds 値、P 値および 95% 信頼区間を求めた。

[研究結果および考察]

これまで、われわれは、日本人の本病患者群を対象としたマイクロサテライトマッピングにより、本病の原因遺伝子は MICA から HLA-B 遺伝子間の 46Kb の領域に存在する可能性が高いことを示してきた。この領域に存在する機能遺伝子は MICA 遺伝子と HLA-B 遺伝子のみであるため、本病の病因遺伝子は MICA 遺伝子または HLA-B 遺伝子のいずれかと考えられた。その後、日本人の MICA 遺伝子解析およびギリシャ人、イタリア人、ヨルダン人、イラン人のマイクロサテライトマッピングにより、本病の原因遺伝子は HLA-B 遺伝子であり、HLA-B51 アリルが主要な疾患感受性遺伝子である可能性が高いことを示した。

したがって、今回、トルコ人およびイラン人において MICA 遺伝子解析を行い、日本人以外の異なる民族においても同様の結果になるか否かを検討した。その結果 47 種類のアリルの内トルコ人では 14 種類、イラン人では 19 種類のアリルを認めた。トルコ人患者群、イラン人患者群ともに MICA009 アリルが有意に増加し、MICA002 アリルが有意に減少していた(表 1、表 2)。患者群と対照群での MICA 遺伝子のアリル頻度を比較すると MICA009 アリルはトルコ人患者群の 74.3% (対照群 29.9%)、イラン人患者群の 63.0% (対照群 29.8%) に認められ、各々正常対照群と比較して有意

に増加していた (トルコ人: RR=6.8%, $\chi^2=18.3$, P=0.000019、イラン人: RR=4.0, $\chi^2=11.1$, P=0.00087) (表 1、表 2)。

血清学的 HLA タイピングでは、HLA-B51 抗原はトルコ人患者群の 62.1% (対照群 38.9%)、イラン人患者群の 62.1% (対照群 38.2%) に認められ、各々対照群と比較して有意に増加していた (トルコ人: RR=2.6%, $\chi^2=6.0$, P=0.0014、イラン人: RR=2.7, $\chi^2=6.4$, P=0.0011)。したがって、日本人の解析結果とは異なり、HLA-B51 頻度よりも MICA009 頻度の方が本病とより強い相関を示した(表 3)。これは、トルコ人およびイラン人健康対照群における HLA-B51 陽性者が、日本人健康対照群に比べて高頻度に存在することに起因すると考えられた (39%、38% v.s. 14%)。

しかしながら HLA-B 遺伝子と MICA 遺伝子は、非常に近接して座位しているため、互いに交絡因子となっている。したがって HLA-B51 の有無を無視して MICA009 アリルのリスク比を算出すること、また、逆に MICA009 の有無を無視して HLA-B51 のリスク比を算出することは危険であり、これらの交絡因子を考慮した層別解析が必要となる。まず、MICA009 アリルの本病への第一義的な影響の有無を調べるため、HLA-B51 陽性群と HLA-B51 陰性群で層別し、Mantel-Haenszel 法により共通オッズ比 (Weighted OR) を算出し、95% 信頼区間を求めた。その結果、トルコ人およびイラン人のどちらの民族においても MICA009 アリルが本病に有意な関与があるとは言えなかった。

逆に、HLA-B51 の本病への関与を調べるため MICA009 アリル陽性群と陰性群に

層別して同様に解析したところ、トルコ人では有意に相関した ($\chi^2 = 6.655$, $p = 0.00989$, 95%CL=0.053~0.953) (表4)が、イラン人では有意な相関を示さなかった。したがって、HLA-B51は本病と第一義的に相関していたが、イラン人では本病と第一義的に相関しているとはいえなかった。

今後、患者群、対照群の人数を増やして、

表1 トルコ人ベーチェット病患者群と対照群のMICAアリル頻度

MIC-A allele	Patients(%) N=35	Controls(%) N=67	R.R.	χ^2	P	Pc
MIC-A*002	1 (2.9)	19 (28.4)	0.07	9.48	0.0011*	0.015
MIC-A*004	0 (0)	9 (13.4)				
MIC-A*006	3 (8.6)	3 (4.5)				
MIC-A*007	2 (5.7)	6 (9.0)				
MIC-A*008	13 (37.1)	29 (43.3)				
MIC-A*009	26 (74.3)	20 (29.9)	6.79	18.33	0.000019	0.00028
MIC-A*010	5 (14.3)	3 (4.5)				
MIC-A*011	2 (5.8)	5 (7.5)				
MIC-A*012	2 (5.8)	4 (6.0)				
MIC-A*016	5 (14.3)	11 (16.4)				
MIC-A*017	0 (0)	1 (1.5)				
MIC-A*018	4 (11.4)	8 (11.9)				
MIC-A*020	1 (2.9)	5 (7.5)				
MIC-A*029	0 (0)	1 (1.5)				

*obtained by the Fisher's exact test; all other values were obtained by the chi-square test

表3 ベーチェット病患者のHLA-B51, MICA009頻度比較

	対照群	患者群	R.R.	χ^2	P値
＜日本人＞					
HLA-B51	13.8	58.9	9.0	47.4	5.9×10^{-12}
MIC-A*009	31.0	69.5	5.1	30.9	2.7×10^{-6}
＜トルコ人＞					
HLA-B51	38.9	62.1	2.6	6.0	1.4×10^{-3}
MIC-A*009	29.9	74.3	6.8	18.3	1.9×10^{-5}
＜イラン人＞					
HLA-B51	38.2	62.1	2.7	6.4	1.1×10^{-3}
MIC-A*009	29.8	63.0	4.0	11.1	8.7×10^{-4}

さらに、解析する必要があると考えられた。

〔結論〕

HLA領域に存在するベーチェット病遺伝子はMICA遺伝子ではなく、HLA-B遺伝子である可能性が高いことが、トルコ人でも示された。今後は多因子遺伝の可能性も視野にいれ解析をすすめていく必要があると考えられた。

表2 イラン人ベーチェット病患者群と対照群のMICAアリル頻度

MIC-A allele	Patients(%) N=53	Controls(%) N=47	R.R.	χ^2	P	Pc
MIC-A*002	8 (14.8)	17 (36.2)	0.32	6.15	0.013	0.25
MIC-A*004	4 (7.4)	5 (10.6)				
MIC-A*006	8 (14.8)	2 (4.3)				
MIC-A*007	3 (5.6)	2 (4.3)				
MIC-A*008	11 (20.4)	15 (31.9)				
MIC-A*009	34 (63.0)	14 (29.8)	4.01	11.09	0.000087	0.017
MIC-A*010	1 (1.9)	1 (2.1)				
MIC-A*011	3 (5.6)	3 (6.4)				
MIC-A*012	3 (5.6)	1 (2.1)				
MIC-A*013	0 (0)	1 (2.1)				
MIC-A*015	0 (0)	1 (2.1)				
MIC-A*016	8 (14.8)	10 (21.3)				
MIC-A*017	3 (5.6)	1 (2.1)				
MIC-A*018	2 (3.7)	3 (6.4)				
MIC-A*019	1 (1.9)	0 (0)				
MIC-A*020	5 (9.3)	5 (10.6)				
MIC-A*022	0 (0)	1 (2.1)				
MIC-A*023	1 (1.9)	0 (0)				
MIC-A*026	1 (1.9)	0 (0)				

表4

Association of HLA-B51 with BD controlling for the effect of MICA009

HLA-B51	Absence of MICA009		Presence of MICA009	
	Contris	BD Cases	Contris	BD Cases
Preset	4	4	14	21
Absent	42	5	5	2
Weighted OR	0.185			
χ^2 square	6.655			
p-value	0.00989			
95% CL	0.053<OR<0.644			

ベーチェット病モデルマウスの開発

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)
水木信久 (横浜市大医, 眼科, 教授)
大野重昭 (北大医, 視覚器病学, 教授)

研究要旨 [目的]ベーチェット病はHLA-B51との関連や様々な環境要因が指摘されているが、本研究では遺伝的要因として考えられている遺伝子をマウスに導入し病態モデルマウスの開発をすることを目的とした。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。また、*HLA-B51* Tgにおける細胞表面へのHLA-B51抗原の発現の改善を試みた。[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 β_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。さらに *HLA-B51* Tg, mouse β_2 mノックアウトマウス、human β_2 m Tgを順に交配した。[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。この眼底変化はTgの背景に用いたC3/C3H系によく見られる変化が混在したものと考えられぶどう膜炎の所見とは異なるものと考えられた。また *MICB* Tgについては、mRNAの発現を認める系統を2系統確立した。*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。FACSscanを用いた解析では *HLA-B51* (tg/-)、mouse β_2 m(tg/tg)、human β_2 m (tg/-)の個体ではHLA-B51単独Tg(tg/tg)よりも末梢血リンパ球細胞表面における *HLA-B51* の発現は増加していた。さらに *HLA-B51* (tg/-)、mouse β_2 m(-/-)、human β_2 m (tg/-)の作成を目指して交配を続けている。

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。ゲノムワイドな解析によりさらに第2、第3のLocusが発見される可能性もあるが今のところHLA-B51が主因と考えられている。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が、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 (ストラスブール, 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.

近年の猪子、水木、太田分担研究者の精力的な解析により、HLA 領域の本疾患の主因遺伝子は HLA-B51 であると統計学的に同定されたため我々も従来からある HLA-B51 Tg の改良に取り組むこととした。このマウスは細胞表面にマウス β_2 ミクログロブリン ($m\beta_2m$) とヒト HLA-B51 が heterodimer に発現しているものと考えられ、これにヒト β_2m ($h\beta_2m$) 遺伝子を導入し、マウス β_2m をノックアウトすることにより、ヒト型 HLA-Class I 抗原を発現するマウスを作成することにした。HLA-B27 と強直性脊椎炎との強い関連性もよく知られるところであるが、この手法は HLA-B27 Tg、 $m\beta_2m$ ノックアウトマウス、 $h\beta_2m$ Tg を交配した例で末梢血リンパ球における細胞表面での発現を改善し爪の変形、四肢の関節炎などの炎症を引き起こした実績を持ち (Sanjay D. Khare *et al.*, 1999) 有用な手法であると考えられた。

(倫理面への配慮)

これらの実験は東海大学医学部動物実験取り扱

・ pCAGGS-MICA



・ pCAGGS-MICB

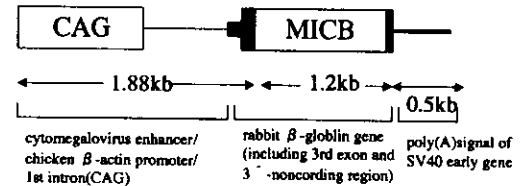


図 1. CAG-MICA, CAG-MICB の構造

い規則に基づきおこなわれた。動物への苦痛を減らすように必要時には十分な麻酔を用いた。

B. 研究方法

ヒト MICA cDNA 及びヒト MICB cDNA を Dr. Bahram (ストラスブール, 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 $20 \mu\text{l}$ 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.

HLA-B51 (tg/tg) と $h\beta_2m$ (tg/-) とを交配し HLA-B51 (tg/-) $h\beta_2m$ (tg/-) に対して末梢血リンパ球細胞表面の汎 HLA 抗体 W32/6 に対する FACScan を用いたフローサイトメトリー法をおこなった. 各臓器において HLA-B51 遺伝子および $h\beta_2m$ 遺伝子がとも発現しているかを調

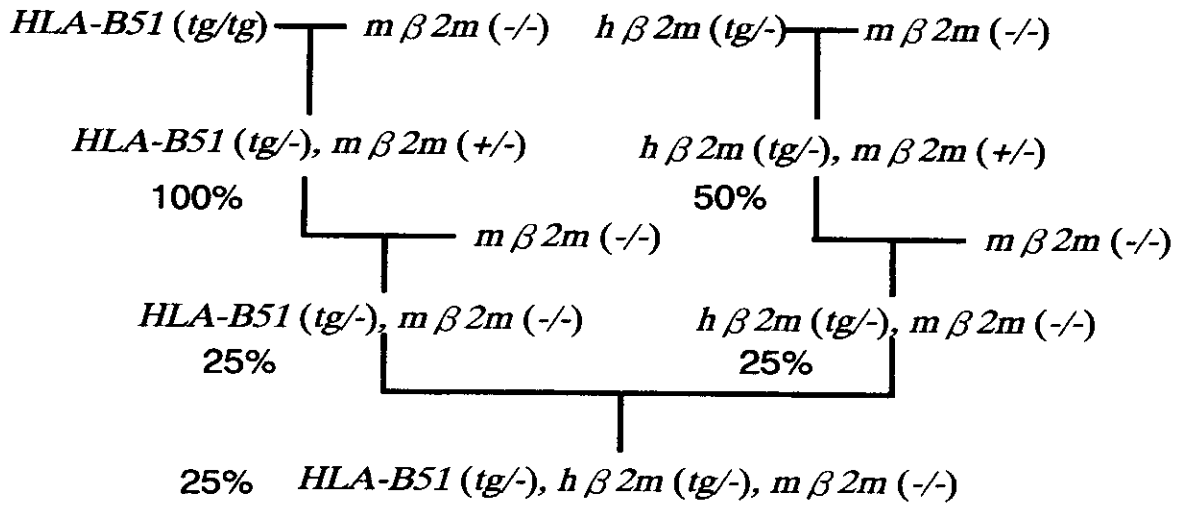


図2. 交配方法1

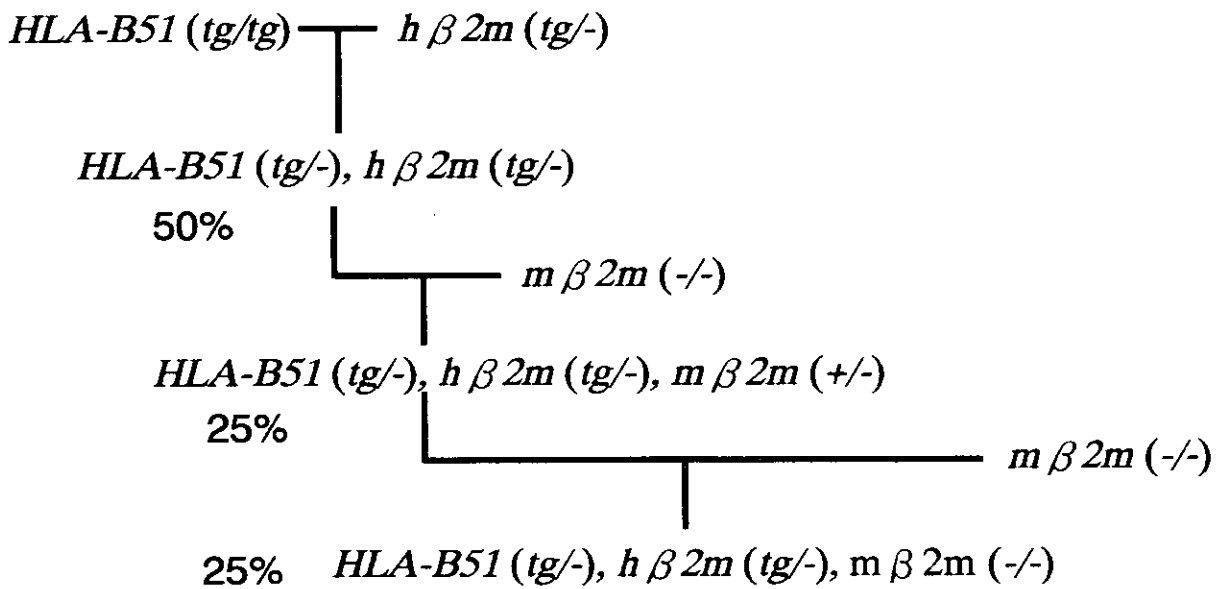


図3. 交配方法2

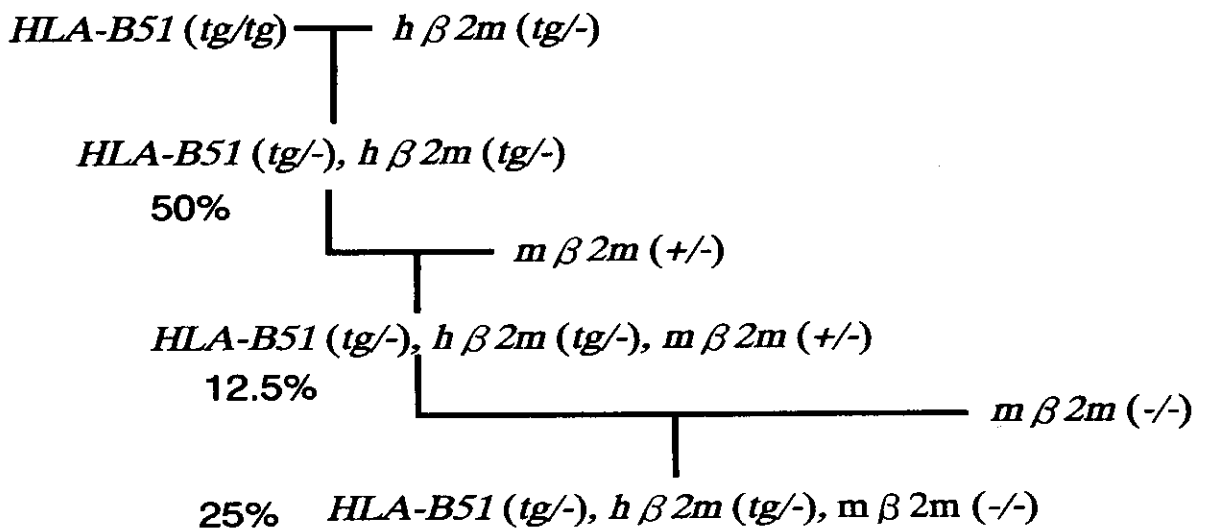


図4. 交配方法3

べるため、脳、胸腺、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、卵巣についてRT-PCRを用いて発現の確認を行った。また、この後の交配方法について次の3手法を考えた。(図2-4)

C. 研究結果

CAG-MICA新生仔F0として合計107匹の離乳マウスを得た。そのうち12匹(♂5匹♀7匹)はMICA cDNA内に検出領域を設定したPCR法で陽性と判定された。(図5) そのうち4匹についてはMICA cDNAをプローブとした genomic Southern法を行い、3匹がTgと判定された。PCR法で陽性となったF0をC57/B6と交配しF1を作製した。101匹以上のF1が産出された。RT-PCR法もしくはNorthern blot法にてMICA mRNAの発現を解析した。(図6)MICA mRNA発現群では非発現群に比べ統計的に有意に赤血球が減少していた。(図7) 加えて、末梢血中のIgGはMICA Tgで増加していた。(図8) また両眼性の、視神経乳頭を中心とした網脈絡膜萎縮、萎縮部以外への色素沈着、網膜動脈、静脈の狭小化、口径不同、血管の白線化をとともなう3系統を見いだした。フルオロセインナトリ

ウム蛍光眼底造影検査では、初期からの網膜色素上皮障害を示唆する脈絡膜過蛍光、網膜動脈、静脈の狭小化、口径不同があったC57BL/6N (2M令4匹、4M令9匹、19M令1匹)、B6C3F1 (2.5M令5匹)、B6C3F1×B6C3F1(7M令8匹)では眼底変化を認めなかった。C3/C3Hの遺伝子未導入マウスで網膜色素変性を認めた。なお、導入遺伝子を再度全長にわたってシークエンスしたところMICA cDNAのアレルはTM領域を除いてはA019と判明した。

CAG-MICB新仔F0として、合計58匹の離乳マウスを得た。この内、27匹のマウスはTgであった。27匹のTgマウスの内、12匹は、ヒトMICB mRNAを発現することがマウス尾より抽出したRNAを用いたRT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction)解析から判明した。Northern解析では皮膚、腎臓などで強く発現がみられた。ヒトMICB mRNA発現群(1系統)では、非発現群(non-Tgを含む)に比べ、有意にその体重の減少(図9)、及び白血球の増加(図10)が認められた。また生後1-2週の間で皮膚の角化異常が認められた(図11)。病理学的には角質層の肥厚、表皮層の肥厚であった。

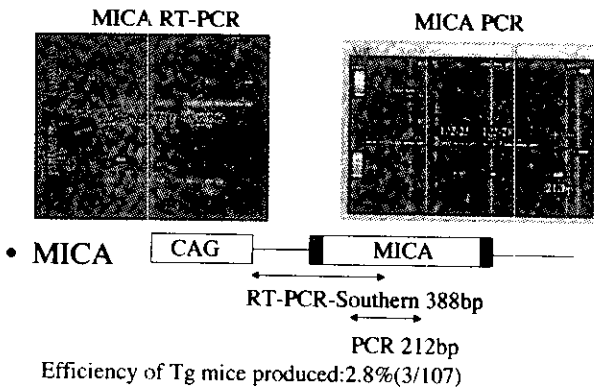


図5. MICA PCR, RT-PCRの一部

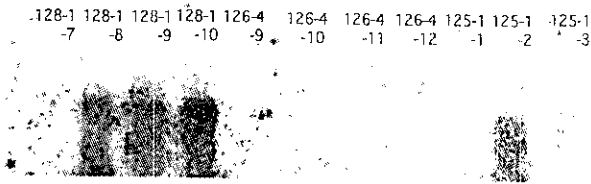


図6. MICA Northern blot法による解析の一部

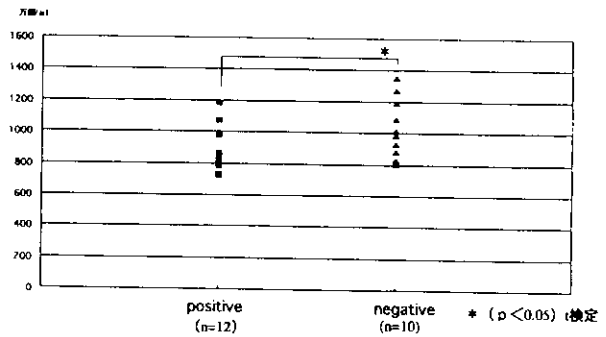


図7. MICA Tg 末梢血中の赤血球数

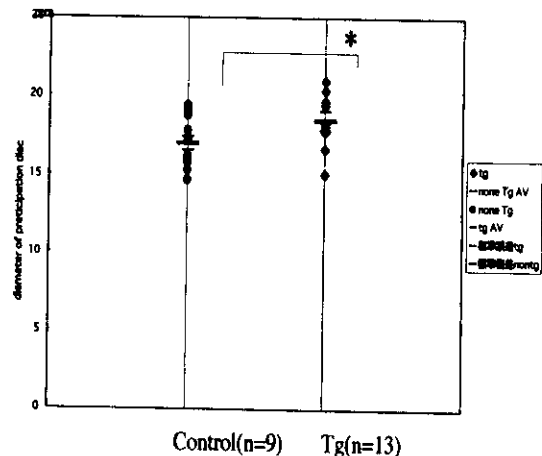


図8. MICA 末梢血中のIgGの増加

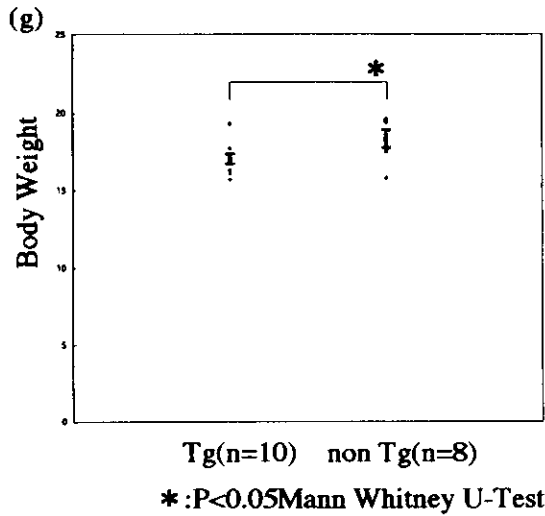


図9.MICB Tgの体重減少

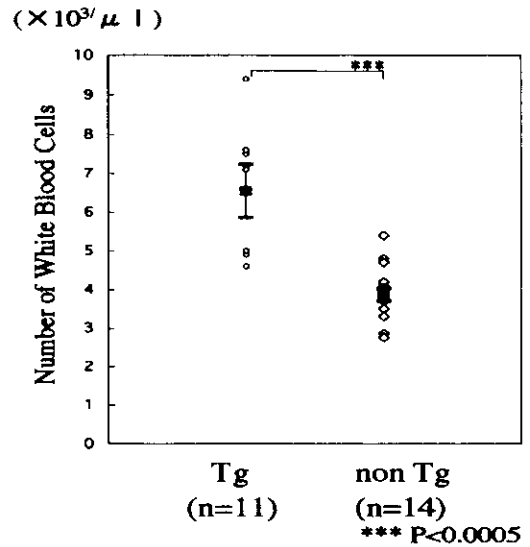


図10.MICB Tgの末梢白血球の増加

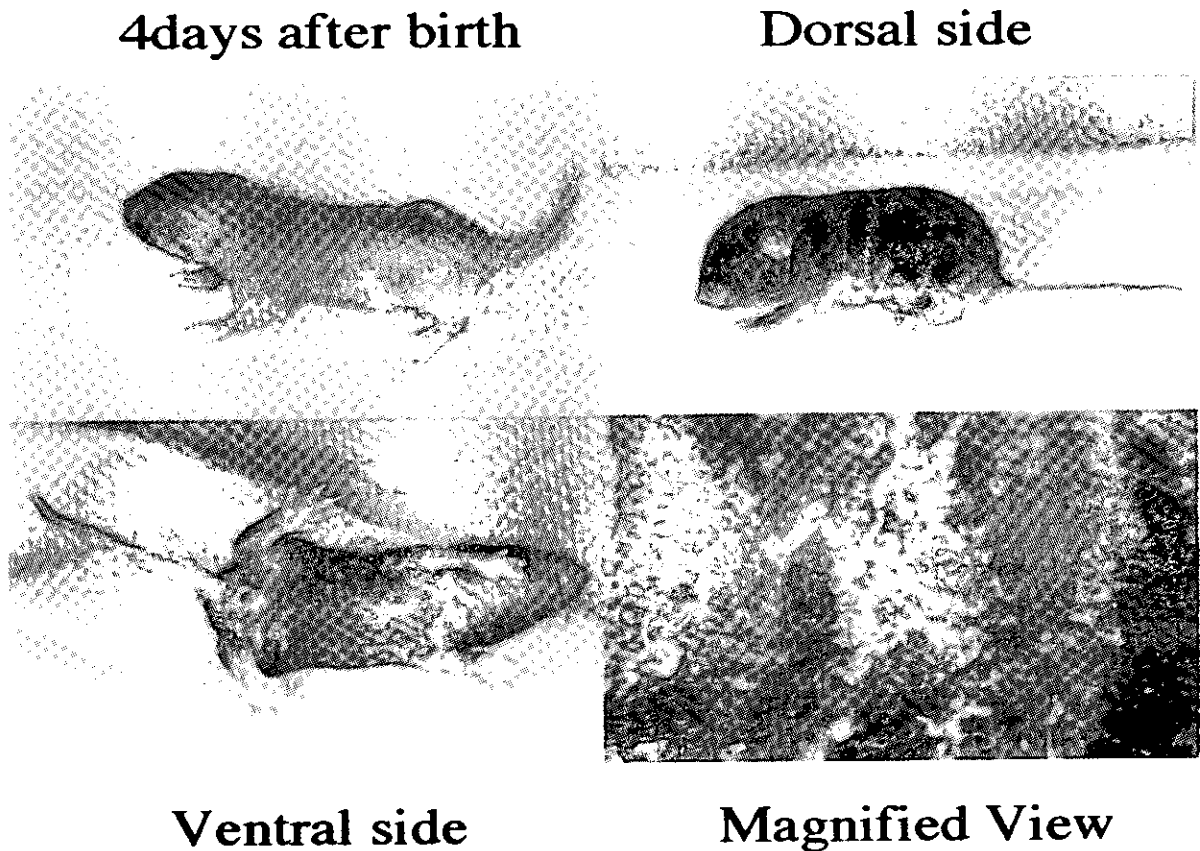


図11.MICB Tg 生後1-2週に見られた皮膚角化
またこの表現系はF1, F2へと伝達された。
眼底の変化はみられなかった。

HLA-B51 (tg/tg)とh β 2m(tg/-)とを交配し
HLA-B51(tg/-)h β 2m(tg/-)に対して末梢血リン
パ球細胞表面の汎HLA抗体W32/6に対する
FACScanを用いたフローサイトメトリー法をお
こなった。この結果HLA-B51(tg/tg)よりも末梢
血リンパ球の細胞表面におけるHLA-B51抗原

の発現は向上していた。また脳、胸腺、肺、心
臓、肝臓、脾臓、腎臓、卵巣においてRT-PCR
を用いてHLA-B51遺伝子およびh β 2m遺伝子
はとも発現していることが確認された。

D. 考察

今回、我々はヒトMICA、MICB遺伝子を導
入したトランスジェニックマウス(Tg)の系統を
確立した。MICA、MICB遺伝子はHLA-B遺伝子
近傍にありベーチェット病との関連が示唆され

FACS Analysis

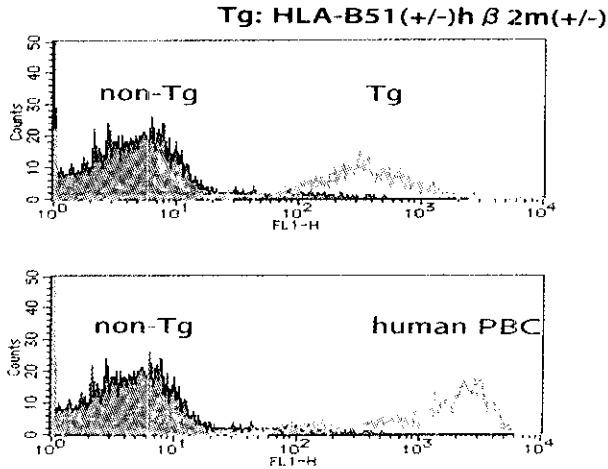


図11 HLA-B51(tg^{-/-})hβ2m(tg^{-/-})のFACSscan

RT-PCR analysis for HLA-B51 and hβ2m mRNA in HLA-B51(tg^{-/-})hβ2m(tg^{-/-}) transgenic mice

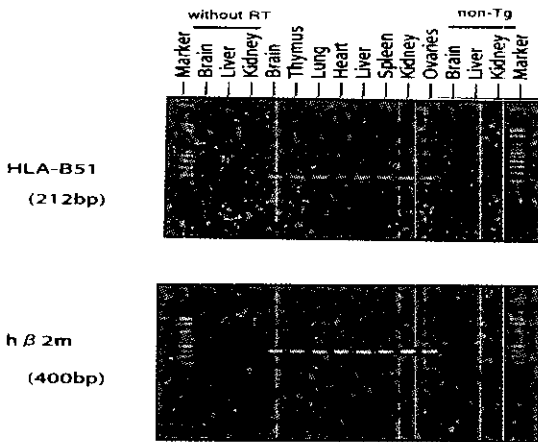


図12 HLA-B51(tg^{-/-})hβ2m(tg^{-/-})のRT-PCRによる発現の確認
ていた。

MICAの過剰発現はマウスに赤血球減少、脈絡膜萎縮を引き起こした。MICA Tgで見られた網脈絡膜萎縮はベーチェット病の末期像に似ていた。網膜色素変性症のモデルマウスとして知られる rds マウスや *tulp1*⁺ マウスでは生後2週目頃には視細胞層の減少が病理学的に明らかになってくる(Stephanie A. HAGstrom *et al.*, 1999)。今回見られた網膜の変性はC3/C3Hに見られる眼底変化と今のところ考えている。しかしMICAの発現する系には眼底変化が発生する率は高い理由は明らかでない。またMICA mRNAを高発現するものは子孫がとりにくく今後の課題となっている。これはMICA自体がマウスにたいし侵襲的であることを示している。また、末梢血中の赤血球の減少は腸管病変による下血

Phenotype の変化のまとめ

	MICA(A5)	MICA(A6)	MICB	B51	B51 × β _{2m}
• 白血球数	—		増加		
• 赤血球数	減少		—		
• 体重	—		減少		
• 皮膚	体幹脱毛		皮膚角化		
• 網脈絡膜萎縮	あり	なし	なし	あり	あり
• 末梢血好中球					亢進*
	Superoxide産生				

*M. Takeno, T. Sakane, 1995 American College of Rheumatology

図13 Phenotype 変化のまとめ

による貧血を反映している可能性がある。動物性由来の成分の影響をさけるため白米のみで1週間ほど飼育した後便潜血を調べたところ有意な所見は得られなかった。

今回の結果よりMICBの過剰発現はマウスに低体重、白血球増多、角化異常といった表現系の変化を引き起こす可能性が示唆された。今のところ低体重、白血球増多は3系統で見られているため、外来遺伝子導入に伴う宿主遺伝子への影響によって引き起こされたとは考えにくく、MICBの過剰発現によるものと考えられる。特にMICB発現Tgマウスに見られる白血球数の顕著な増加は注目すべき点と思われる。ベーチェット病の最も特徴的な細胞学的現象の一つは、好中球の炎症組織内への浸潤(aseptic neutrophil infiltration)と考えられている。この好中球は、特にsuperoxide過剰産生好中球としての特徴がある。興味深いことに、ベーチェット病発症に深く関連するとされる遺伝子HLA-B51を導入されたTgマウスでは、FMLP刺激によるsuperoxide過剰産生好中球の数が増加していることが示された(Takeno *et al.*, 1995)。しかし、残念ながらこのマウスでは、ベーチェット病に付随する様々な症状(皮膚の炎症、眼のブドウ膜炎の発症、口腔内アフタ、陰部潰瘍等)は見出されていない(Takeno *et al.*, 1995)。MICB発現Tgマウスに見られた白血球数の顕著な増加は、このsuperoxide過剰産生好中球の数の増加を反映しているのか、今後、詳細な解析が必要である。

皮膚の角化異常については1系統では明確にあらわれ、別の1系統では一部のF1にのみ認められたため、MICBの過剰発現がこの変化を引

き起こす責任遺伝子であるかしばらく観察が必要である。角化異常部位の病理学的検索では、角質層の肥厚、表皮層の肥厚が見られた。基底細胞層の分裂速度が何らかの影響で上昇し角化異常症を引き起こしている可能性がある。若年で発症しその後改善する点と病理組織像よりこの炎症所見はヒトの魚鱗癬とにていると考えられた。細胞表面上にMICA、MICBタンパク質を発現した細胞は腸管上皮に存在する $\gamma\delta$ T細胞に認識され細胞障害を受けることが明らかになっている。(Groh *et al.*, 1998) マウス皮膚は $\gamma\delta$ T細胞の豊富に存在する部位でありMICB Tg皮膚でも同様の変化が起こる可能性がある。皮膚角化異常部の免疫組織学的検索が必要となる。抗マウス $\gamma\delta$ T cellによる角化異常部の免疫染色を行ったが、真皮内の炎症細胞が少なく陽性細胞は判定出来なかった。今後皮膚の採材部位及び時期を検討し再検する必要があると思われる。

MICAとMICBは、MHCクラスI配列と比較した場合、細胞外ドメインである $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ との相同性は27%と極めて低いが、立体構造的にはHLAクラスI抗原と酷似するので、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)。しかし、HLAクラスI抗原とは異なり、 $\beta 2$ -microglobulinとは結合していないとされる (Bahram *et al.*, 1994)。従って、MICAとMICBは、古典的なMHCクラスI抗原提示の系には関係しないのではないかと予測もある。MICAに対するmonoclonal抗体による免疫組織化学的解析からMICAタンパク質は、小腸上皮にのみ局在することが判明した (Groh *et al.*, 1996) が、これは、MICAが腸上皮細胞内リンパ系におけるT細胞サブセットへのリガンドとして機能する、言い換えれば、特殊的なT細胞の免疫監視系において機能することを示唆している。しかも、MICA及びMICBの発現は熱ショック誘導性を示し、MICA及びMICB遺伝子 promoter内には、熱ショック応答性 elementが存在することから (Groh *et al.*, 1996)、一方では、cell stress response遺伝子の一つではないかとされている。細胞表面上にMICA、MICB蛋白質を発現した細胞は腸管上皮に存在する $\gamma\delta$ T細胞に認識され細胞障害を受

けることが明らかになっている。(Groh *et al.*, 1998)。今回の研究で見られた慢性の炎症所見はMICA、MICBの過剰発現がマウスにたいし”ストレスが継続的にかかった状態”を作り出した結果であると考えられた。今後はリンパ球サブセットの変化や血中の蛋白分画などに影響がないか検討が必要である。

HLA-B51、h $\beta 2$ mを交配することでヒト型のHLA抗原を細胞表面に発現させることが可能になる。これによってHLA-B51抗原をより強力に生体内で働かせることが期待される。この手法はHLA-B27と強直性脊椎炎モデルマウス、ラットでも実績があり、想定される外来要因の負荷を行う場合にも有用であると考えられる。さらにm $\beta 2$ mノックアウトマウスとの交配を前述の手法で現在進めている。HLA-B51 (tg/-)h $\beta 2$ m (tg/-)m $\beta 2$ m (-/-)の個体も一部生まれており、その末梢血リンパ球のFACScanは採血量が少ないためもあるがHLA-B51 (tg/-)h $\beta 2$ m (tg/-)の場合とほぼ同程度の発現を示していた (データ未公表)。

MICA及びMICBの機能は何であるか、今持ってその実体は明らかでないが、これらタンパク質を過剰発現するTgマウスを用いることにより、その実体解明にいくらかでも接近出来るのではないかと考えている。またHLA-B51マウス改良は想定さえる外来要因の負荷にも有用であり今後は是非とも必要な系統である。免疫系への影響の解明には個体を用いた研究が必要となる。そして、その解明の過程の先に、これらのタンパク質とベーチェット病発症との因果関係が明らかにされるものと期待される。

E. 結論

MICA Tgでは貧血、末梢血IgGの増加、MICB Tgでは白血球増加、低体重、皮膚角化が見られた。これらの遺伝子はマウスに対し何らかの炎症を引き起こすことがわかった。

HLA-B51とh $\beta 2$ mの交配は末梢血リンパ球細胞表面におけるHLA-B51抗原の発現の改善に有用であった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Suemizu, H., Radosavljevic, M., Kimura, M., Sadahiro, S., Yoshimura, S., Bahram, S. and Inoko, H. A Basolateral Sorting Motif in the MICA Cytoplasmic Tail, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. In press 2002

2. Shiina, T., Ando, A., Suto, Y., Kasai, E., Shigenari, A., Takishima, N., Kikkawa, E., Iwata, K., Kuwano, Y., Kitamura, Y., Matsuzawa, Y., Sano, K., Nogami, M., Kawata, H., Li, S., Fukuzumi, Y., Yamazaki, M., Tashiro, H., Tamiya, G., Kohda, A., Okumura, K., Ikemura, T., Soeda, E., Mizuki, N., Kimura, M., Bahram, S. and Inoko, M. Genomic Anatomy of Premier Major Histocompatibility Complex Polymorphic Region on Chromosome 1q21-22. Genome Research 11:789-802. 2001

3. 野村英一、水木信久、大野重昭 HLA と眼疾患 編集者 大野重昭 NEW MOOK 眼科「眼の自己免疫疾患」金原出版 東京 2002年 未定

4. Kimura, M., Kimura, T., Sato, M., Watanabe, T., Ohno, S., Inoko, H. and Nomura, E. An Attempt to Create a Behcet's Disease Model in Mice. Ed by Ohno, S & Zierhut, M. "Immunology of Behcet's disease" Swets & Zeitlinger Lisse, The Netherlands in press

2. 学会発表

野村英一、伊藤典彦 マウスの網膜色素変性比較眼科学会基礎部会 2001.12.8 東京

F. 引用文献

Bahram, S., Bresnahan, M., Geraghty, E., and Spies, T. (1994) A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 6259-6263.

Bahram, S. and Spies, T. (1996) Nucleotide sequence of a human MHC class I MICB cDNA. Immunogenetics 43, 230-233.

Bahram, S., Mizuki, N., Inoko, H., and Spies, T. (1996a) Nucleotide sequence of the human MHC class I MICA gene. Immunogenetics 44, 80-81.

Bahram, S., Shiina, T., Oka, A., Tamiya, G., and Inoko,

H. (1996a) Genomic structure of the human MHC class I MICB gene. Immunogenetics 45, 161-162.

Groh, V., Bahram, S., Bauer, S., Herman, A., Beauchamp, M., and Spies, T. (1996) Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 12445-12450.

Groh, V., Steinle A., Bauer S., Spies T., Recognition of Stress-induced MHC Molecules by Intestinal Epithelial $\gamma \delta$ T Cells. Science, 279. 1737-1740. 1998

Mizuki N., Ando H., Kimura M., Ohno S., MiyataShoji, Yamazaki M., Tashiro H., Watanabe K., Ono A., Taguchi S., Sugawara C., Fukuzumi Y., Okumura K., Gotoh K., Ishihara M., Nakamura M., Yonemoto J., Kikuti Y. Y., Shina T., Chen L., Ando A., Ikemura T., and Inoko H. (1997) Nucleotide Sequence Analysis of the HLA Class I Region Spanning the 237-kb Segment around the HLA-B and -C Gene. GENOMICS 42, 55-66

Miyazaki J., Takaki S., Araki K., Tashiro F., Tominaga A., Takatsu K. and Yamamura K-I. Expression vector system based on the chicken β -actin promoter directs interleukin-5. Gene. 79, 269-277

Mizuki, N., Ota, M., Kimura, M., Ohno, S., Ando, H., Katsuyama, Y., Yamazaki, M., Watanabe, K., Goto, K., Nakamura, S., Bahram, S., and Inoko, H. (1997) Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: A strong association of six GCT repetitions with Behcet's disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 1298-1303.

Sanjay D. Khare. B27 transgenic mice lacking $\beta 2$ -microglobulin: a model of human spondyloarthropathies. J. Exp. Med. 182, 1153-1158

Stephanie A. Hagstrom, Mabel Duyano, Michael A North, and tiansen Li (1999) Retinal Degeneration in tulp1^{-/-} mice: Accumulation in the interphotoreceptor Matrix. IOVS

Takeno, M., Kariyone, A., Yamashita, N., Takiguchi, M., Mizushima, Y., Haneoka, H., and Sakane, T. (1995) Excessive function of peripheral blood neutrophils from patients with Behcet's disease and from HLA-B51 transgenic mice. Arthritis Rheumat. 38, 426-433.

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

イラン・トルコ人のベーチェット病患者における *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

ベーチェット病は多因子性遺伝子疾患と考えられ、HLA-B51 遺伝子以外にも疾患感受性遺伝子の存在が示唆される。昨年、我々は免疫反応において抗原特異的な 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 領域内多型(A/G,Thr/Ala)と日本人ベーチェット病患者との相関を解析した。その結果患者群において 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, $\chi^2=11.34$, $p<0.0008$)。今回は、異なった民族でも *CTLA-4* エクソン1 遺伝子の多型がベーチェット病感受性について同様の傾向を示すかを確認するため、イラン人、トルコ人のベーチェット病患者について相関解析を行った。また、*CTLA-4* 遺伝子近傍のマイクロサテライトを用いて相関解析を行い、疾患感受性遺伝子の絞り込みを行った。その結果、イラン人、トルコ人のベーチェット病患者においても *CTLA-4* 遺伝子エクソン1 内の A/G 多型で、G 保有者は健常人対象群に比べて有意な増加を示し (イラン人: Relative Risk = 3.0, $\chi^2=8.7$, $p=0.003$, トルコ人: Relative Risk =3.1, $\chi^2=7.1$, $p=0.008$)、*CTLA-4* 遺伝子もベーチェット病感受性遺伝子の候補として考えられた。

A. 研究目的

我々はベーチェット病発症に人の組織適合性抗原である HLA-B51 が primary な遺伝的要因であることを、HLA 領域内のマイクロサテライトを

用いたゲノムマッピングを用いて確認してきた¹⁻³⁾。しかし、本疾患の発症機序を HLA-B51 遺伝子のみで説明することは困難であり、それ以外の遺伝子が疾患発症に関与している可

能性が考えられる。そこで、本疾患の第2、第3の感受性遺伝子を検索するにはゲノムワイドな解析が必要と考えられ、昨年度初めての試みとして第2番染色体長腕 2q33 にある、*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) と日本人ベーチェット病患者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。その結果日本人のベーチェット病患者は健常人に比べて有意に G 保有者が増加しており、ベーチェット病発症に *CTLA-4* 遺伝子が関与していることを認めた。そこで、今回は、他民族においても *CTLA-4* 遺伝子がベーチェット病の疾患感受性遺伝子であるかを検討するために、イラン、トルコの両民族について *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) の相関解析を行った。

B. 研究方法

CTLA4 エクソン1内の多型、その近傍のマイクロサテライト解析に用いたイラン、トルコ両民族のベーチェット病患者、健常人からの genomic DNA は、すでに HLA タイピング、HLA 領域内のマイクロサテライト解析に使用したものである⁹⁾。

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 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、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。患者 DNA、健常人 DNA を用いた多型検査は、血液採取時に informed consent を得たものについて行った。

C. 研究結果と考察

CTLA-4 分子は細胞障害性 T 細胞に特異的に発現し、T 細胞の活性化の誘導、持続、終息に影響をおよぼし、

通常の休止期には APC(antigen presenting cell)上の CD80/CD86 分子と結合し、T 細胞の活性化を押さえている。また、一旦活性化された T 細胞には、*CTLA-4* シグナルが抑制的に作用し、T 細胞の沈静化を行う。このように、*CTLA-4* 分子は、つねに T 細胞の活性化を抑制する機能を果たしている。

この *CTLA-4* 遺伝子の多型は、遺伝子のプロモーター領域-318 における (C/T) とエクソン 1 領域+49 での (A/G) の一塩基置換と、エクソン 3 部にある (AT)_n の STR(short tandem repeat)多型が見つかっており、今回は、イラン人、トルコ人のベーチェット患者と健常人から得たゲノム DNA を用いてエクソン 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 1 と 2 に示すように、患者群には G アリル陽性者が健常人対象群に比べ有意に増加していた (イラン人 : 78% vs 40%, odds ratio=3.02; 95%CI;1.44-6.31, $\chi^2=8.66$, p=0.003、トルコ人 : 76% vs 50%, odds ratio=3.10; 95%CI;1.34-7.15,p=0.008)。

また、第 2 番染色体長腕 2q33 にある *CTLA-4* 遺伝子の近傍にあるマイクロサテライトを用いて、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 (図 1)。

免疫反応に重要な機能をはたす costimulatory molecule である *CTLA-4* 遺伝子の多型とベーチェット病疾患感受性の相関は、日本人のみだけではなく、イラン人、トルコ人においても認められ、*CTLA-4* 遺伝子がベーチェット病発症の遺伝的素因の一つと示唆された。

D. 結論

イラン、トルコ両民族のベーチェット病患者でも、*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。昨年日本人ベーチェット病患者においても、G が有意に増加しており、3 民族に共通してこの一塩基置換がベーチェット病感受性と相関することは、HLA-B51 遺伝子と同様、*CTLA4* 遺伝子も疾患感受性の候補遺伝子として考えられる。また、この病気が多因子性疾患と思われることから、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. 参考文献

- 1) Mizuki N, Ota M, Kimura M, et al., PNAS, 94:1298-1303, 1997.

- 2) Ota M, Mizuki N, Katsuyama Y, et al.,
Am J Hum Genet, 64:1406-1410,1999.
- 3) Mizuki N, Ota M, Yabuki K, et al.,
IOVS, 41:3702-3708,2000.
- 4) Mizuki N, Ota M, Katsuyama Y, et al.
Tissue Antigens, 57:457-462, 2001
5. Mizuki N, Yabuki, K,Ota M, et al.,
Microsatellite mapping of a susceptible
locus within the HLA region for
Behcet's disease using Jordanian
patients. Hum Immunol. 62:186-190,
2001

F. 研究発表

論文発表

1. Seki SS, Sugimura K, Ota M, et al.,
Stratification analysis of MICA triplet
repeat polymorphisms and HLA
antigens associated with ulcerative
colitis in Japanese. Tissue Antigens,
58:71-76,2001.
2. Mizuki N, Ota M, Katsuyama Y, et al.,
HLA-B*51 allele analysis by the PCR-
SBT method and a strong association
of HLA-B*5101 with Japanese
patients with Bahcet's disease. Tissue
Antigens, 58:181-184,2001.
3. Obuchi N, Takahashi M, Nouchi T, et
al., Identification of MICA alleles with
a long Leu-repeat in the
transmembrane region and no
cytoplasmic tail due to a frameshift-
deletion in exon 4. Tissue Antigens,
57:520-535,2001
4. Mizuki N, Ota M, Katsuyama Y., et al.,
HLA class I genotyping including
HLA-B*51 allele typing in the Iranian
patients with Behçet's disease. Tissue
Antigens, 57:457-462, 2001
6. Sugimura K, Ota M, Matsuzawa J, et
al., A close relationship of triplet repeat
polymorphism in MHC class I chain-
related gene A (MICA) to the disease
susceptibility and behavior in
ulcerative colitis. Tissue Antigens.
57:9-14, 2001
7. Ota M, Katsuyama Y, Kimura A. et al.,
A second susceptibility gene for
developing rheumatoid arthritis in the
human MHC is localized within a 70
kb interval telomeric of the TNF genes
in the HLA class III region. Genomics,
71:263-270, 2001.

Table 1. *CTLA4* polymorphisms in Iranian patients with Bechet disease and healthy individuals

		Patients (n=70) (%)	Healthy (n=52) (%)	χ^2 value	P value ^a	OR ^b (95%CI ^c)
Genotype frequency						
<i>CTLA4</i>	49A/A	23 (32.9)	47 (90.4)	10.6	0.005	5.2 (1.3-21.4) ^d
	49A/G	35 (50.0)	19 (36.5)			
	49G/G	12 (17.1)	2 (3.8)			
Allele positivity						
<i>CTLA4</i>	A present	58 (82.9)	50 (96.2)	0.2	0.02	3.0 (1.4-6.3)
	G present	47 (67.1)	21 (40.4)	8.7	0.003	
Allele frequency						
<i>CTLA4</i>	A allele	81 (57.9)	81 (77.9)	10.7	0.001	2.6 (1.5-4.5)
	G allele	59 (42.1)	23 (22.1)	10.7	0.001	

^a P values were calculated by χ^2 test 3x2 contingency table (df=2), or by χ^2 test 2x2 contingency table (df=1).

^b OR, odds ratio.

^c 95%CI, 95% confidence interval.

^d $\chi^2=5.2$, P=0.02

Table 2. *CTLA4* polymorphisms in Turkish patients with Bechet disease and healthy individuals

		Patients (n=41) (%)	Healthy (n=72) (%)	χ^2 value	P value ^a	OR ^b (95%CI ^c)
Genotype frequency						
<i>CTLA4</i>	49A/A	10 (24.3)	36 (50.0)	8.7	0.01	3.3 (1.3-21.4) ^d
	49A/G	23 (56.1)	31 (43.1)			
	49G/G	8 (19.5)	5 (6.9)			
Allele positivity						
<i>CTLA4</i>	A present	33 (80.5)	67 (93.1)	0.3	0.04	3.1 (1.3-7.2)
	G present	31 (75.6)	36 (50.0)	3.0	0.008	
Allele frequency						
<i>CTLA4</i>	A allele	43 (52.4)	103 (71.5)	8.3	0.003	2.3 (1.3-4.0)
	G allele	59 (47.6)	41 (28.5)	8.3	0.003	

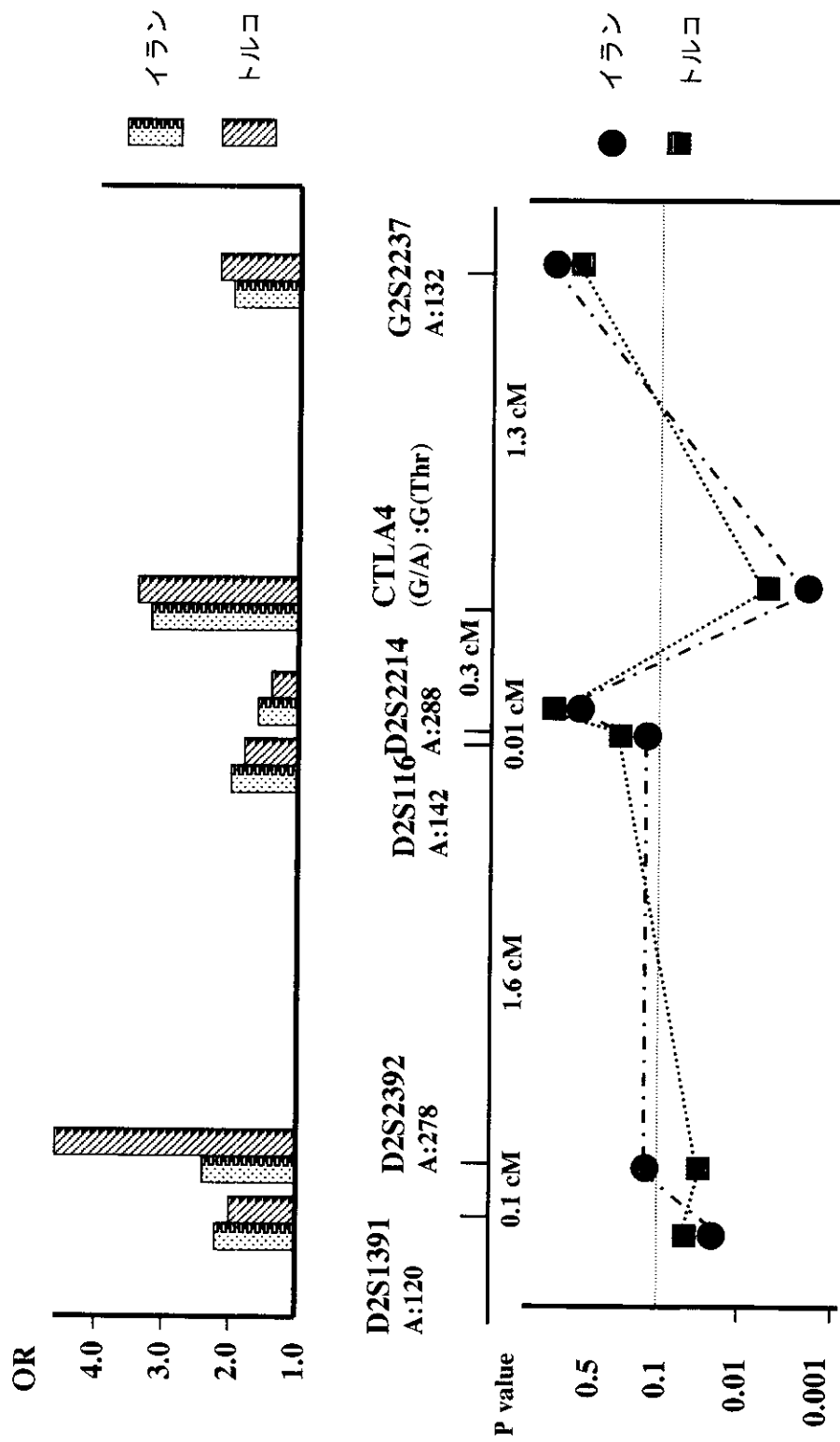
^a P values were calculated by χ^2 test 3x2 contingency table (df=2), or by χ^2 test 2x2 contingency table (df=1).

^b OR, odds ratio.

^c 95%CI, 95% confidence interval.

^d $\chi^2=4.1$, P=0.04

図1. イラン、トルコ人のベーチェット病とCTLA4 遺伝子との相関



ベーチェット病における MICA 膜貫通部分ペプチドと反応する T 細胞の解析

分担研究者 桑名 正隆 (慶應義塾大学医学部、先端医科学研究所)
研究協力者 安岡 秀剛 (慶應義塾大学医学部、内科)
河上 裕 (慶應義塾大学医学部、先端医科学研究所)

研究要旨

ベーチェット病と関連する遺伝的素因として HLA-B51 と MICA 膜貫通部分のマイクロサテライト領域の A6 配列が報告されているが、これら要因がベーチェット病の病態にかかわる機序はいまだ明らかではない。我々は HLA-B と MICA の両者がベーチェット病の病態と関連する可能性を考え、そのひとつのメカニズムとして CD8⁺T 細胞が B51 分子に提示された MICA-A6 部分を含むペプチドを認識する仮説を考えた。昨年度の本研究室において MICA-A6 部分を含む合成ペプチド (A6 ペプチド) を認識する T 細胞が一部のベーチェット病患者で検出されることを報告した。そこで、本年度は A6 ペプチドに対する T 細胞反応性と HLA-B51 の有無および眼病変の活動性との関連を検討した。ベーチェット病 12 例、健常人 4 例の末梢血 T 細胞を自己の抗原提示細胞と IL-2 存在下で A6 ペプチドで反復刺激し、得られた T 細胞株の A6 ペプチド刺激により産生される IFN- γ を測定した。A6 ペプチドによる IFN- γ 産生誘導は B51 陽性ベーチェット病 7 例中 3 例で観察されたが、B51 陰性ベーチェット病 5 例、健常人 4 例では検出されなかった。A6 ペプチド反応性 T 細胞が検出された例はすべて疾患活動性を有しており、治療による眼病変の改善により IFN- γ の産生誘導は消失または減少した。以上の成績から、MICA-A6 部分を認識する CD8⁺T 細胞は B51 陽性ベーチェット病患者の末梢血中に存在し、ベーチェット病の炎症性病態に関与する可能性が示された。

A. 研究目的

ベーチェット病は口腔潰瘍、外陰部潰瘍、眼・皮膚症状を主徴とした全身性炎症性疾患であるが、その病態はいまだ明らかでない。ベーチェット病の遺伝的素因として古くから HLA-B が知られており、約 55% のベーチェット病患者で B51 が検出される¹⁾。近年 Mizuki らによる第 6 染色体短腕のマイクロサテライトマーカーを用いた解析の

結果、HLA-B 遺伝子座近傍の MICA (MHC class I chain-related gene A) 遺伝子産物の膜貫通部分に存在するマイクロサテライト多型とベーチェット病との強い関連が見い出された²⁾。MICA の膜貫通領域には gct 配列の繰り返しによる遺伝子多型が存在し、その結果 gct がコードするアラニン数が 3-10 個のアリルが存在する。ベーチェット病では gct が 6 回反復するマイクロサテ