

猪子英俊 ポストゲノムシーケンシングとしてのゲノム多様性解析と比較ゲノム解析ーヒトHLA領域をモデルとしてー、第6回ESセミナー、滋賀医大、2002

猪子英俊 MICをはじめとする新しい非古典的クラスI抗原について、第74回臨床HLA研究会、2002

猪子英俊 マイクロサテライトを用いた多因子疾患関連遺伝子同定の戦略、第11回国際医療協力シンポジウム、2002

猪子英俊 MICをはじめとする新しい非古典的クラスI抗原について、第74回臨床HLA研究会、2002

猪子英俊 HLAと疾患感受性 HLA領域から全ゲノムの疾患遺伝子同定の戦略に向けて、移植感染症学講演会、2002

猪子英俊 マイクロサテライトを用いた多因子疾患関連遺伝子同定の戦略、白河動物遺伝学研究所、2002

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マッピング、第25回日本分子生物学会シンポジウム「疾患関連遺伝子同定の戦略」、2002

椎名隆、猪子英俊 シーケンシングによるMHC領域の比較ゲノム解析、第25回日本分子生物学会ワークショップ「ヒトゲノム塩基配列を読むー真の解読完了のために何かが必要かー」、2002

猪子英俊 マイクロサテライト多型を用いたゲノムワイドな疾患遺伝子探索、国立遺伝学研究所研究集会「人類集団における遺伝子レベルとゲノムレベルにおける多様性」、2003

厚生労働科学研究費補助金(特定疾患対策研究事業)

分担研究報告書

ゲノムワイドなマイクロサテライトマーカーによる

ベーチェット病原因遺伝子検索に関する研究

分担研究者 水木 信久

(研究要旨)

ベーチェット病は人種を越えて HLA-B51 抗原と相関することが知られている。ベーチェット病患者群と健常群を対象として、各個人の DNA 濃度を一定に調整し混合した pooled DNA を用いて PCR を行い、全ゲノムをカバーする多型性豊富なマイクロサテライトマーカーのアリル分布の比較、解析を行うことによって、病因遺伝子を検索するプロジェクトを開始した。現在 17 番染色体の 1 次スクリーニングが終了し、今後他の染色体についても解析を進めていく予定である。

協力研究者

山根 敬浩¹⁾ 滝山 直昭¹⁾ 尾本 周¹⁾ 西田 朋美¹⁾ 伊藤 典彦¹⁾

岡 晃²⁾ 田宮 元²⁾ 猪子 英俊²⁾

1) 横浜市立大学医学部眼科

2) 東海大学医学部分子生命科学2

研究目的

ベーチェット病は全身の諸臓器に急性の炎症を繰り返す原因不明の難治性疾患である。本病は遺伝的素因として HLA-B51 抗原と顕著に相関することが知られており、近年 HLA-B 遺伝子近傍の MICA 遺伝子との相関も報告されている。しかし、ベーチェット病患者では、どの民族においても HLA-B51 抗原陽性頻度は 60%前後であり、残りの 40%前後は HLA-B51 抗原以外の他の HLA-B 抗原を有している。また、HLA-B51 抗原陽性者のうち、本病を発症するのはほんのわずかにすぎない。したがって、本病発症には HLA-B51 対立遺伝子以外の他の遺伝子も関与している可能性が考えられ、これら複数の遺伝的素因が備わった場合に、なんらかの外的環境要因が働いて初めて発症すると考えられる。今回われわれは、全ゲノムを網羅する多型性豊富なマイクロサテライトマーカーを用いることによってゲノムワイドな疾患遺伝子マッピングを行い、HLA-B51 対立遺伝子以外の疾患感受性遺伝子を検索することを目的とする。

研究方法

疾患遺伝子検索法として全染色体、全ゲノムを対象としたゲノムワイドなマイクロサテ

ライトマッピング法を用いる。マイクロサテライト(MS)とはヒトゲノム上に散在する数塩基単位の反復配列のことで、この反復配列はその反復回数に多型性、すなわち個人差があることが知られている。つまり患者群と対照群でアレル分布を比較することにより、疾患遺伝子マッピングの有用な遺伝マーカーとなりうる。MSはSNPに比べ遺伝的多型性ははるかに豊富で、連鎖不平衡を示す距離もSNPに比べはるかに長い。ため、より効率的に疾患遺伝子マッピングが可能である。ヒト全ゲノム塩基配列は3.1GB(31億塩基対)であるが、すでに我々は100kb(MSの連鎖不平衡の距離)毎に全ゲノムをカバーする多型性豊富なMSを約3万個($3.1\text{GB} \div 100\text{kb} = 3.1$ 万個)収集した。したがって、まずMSマッピングにより効率的にベアレット病原因遺伝子の候補領域を100kb以内に絞り込み、次にその絞り込まれた領域内でSNP解析を行い、疾患遺伝子および疾患特異的な変異を同定していく。まず現在までに収集した患者検体244サンプルに対し、DNAを抽出しセルライン化(不死化)を行う。

1次スクリーニングのpooled DNA用に244患者サンプルより無作為に100サンプル抽出する。対照群は発症年齢、性別をマッチングさせた健常群100サンプルを用いる。DNAはQiagenDNABloodMaxiKitを用いて抽出し、PicoGreen定量キット(PicoGreen dsDNA Quantification Reagent and Kit 200-2000 assays)を使用し、96穴蛍光マイクロプレートリーダーMTP-100Fによる定量および、データ処理ソフトMTP-SF5による検量線の作成、DNA濃度の算出を行う。各サンプル計3回の定量を行い、変動係数(C.V.)が5%以内の値の平均をDNA濃度として採用する。

定量の後、各サンプルの濃度を一定に調整したpooled DNA溶液を作成し、このpooled DNAを鋳型としてPCRを行い、ゲノムワイドに設定した約3万個のマイクロサテライトマーカーのアレル頻度を解析する。Pooled DNA法では、増幅したPCR産物の電気泳動上の波形パターンをもとにして、推定アレル頻度を求める。これは波形パターンからすべてのピークの高さの総和を求め、その値に対してそれぞれのピークの高さの割合を求めることによって推定頻度を算出する。その後、遺伝的相関解析を行い、相関を示したマーカーに関して別の集団を用いて二次スクリーニングを行う。このようにして相関解析により疾患感受性候補領域を100kb程度に絞り込んだ後に、各感受性領域内でSNP(single nucleotide polymorphism)マーカーを用いて狭い範囲で連鎖不平衡を検出していく。

(倫理面への配慮)

すべての血液提供者に対して研究の意義、目的、使用法等を説明し、同意を得た上で採血を行っている。得られた個人情報に関しては厳重に他に漏洩しないように管理されている。

研究結果および考察

ゲノムワイドなMSマッピングはケースコントロールスタディであるため、統計学的有

意差検定を行うには疾患群および対照群ともに 500 人前後必要である。このためベーチェット病友の会や複数の施設に呼びかけ、患者検体収集を続けている。

現在までに 244 人のベーチェット病患者(表1)の血液検体すべてから DNA を抽出した。DNA を半永久的に保存するため、セルライン化(不死化)も行っている。その中から 1 次スクリーニング用に 100 サンプル無作為に抽出した。1 次スクリーニング用 100 サンプルの内訳は、男性:56 人、女性:44 人、平均発症年齢:35.59 歳、完全型:43 人、不全型:57 人であった(表2)。このサンプルを用いて pooled DNA 作成し、17 番染色体に設定した MS マーカーについて 1 次スクリーニングを終了した。統計学的に有意となった MS マーカーについては、2 次スクリーニング用にリストアップした。電気泳動の波形パターンを解析し、PCR 不良、泳動不良なデータに関しては、他の染色体の MS マーカーの電気泳動終了後にまとめて再泳動する。今後、全染色体をカバーする MS マーカーの 1 次スクリーニングおよびデータの統計学的解析を行うことにより、2 次スクリーニングへ移行するマーカーを選出する。2 次スクリーニングも同様に行い、3 次スクリーニング、SNP 解析へと進めていく予定である。

結論

今後も他の染色体について同様に解析を進め、疾患感受性領域を絞り込んでいくことによって、多因子遺伝疾患であるベーチェット病の病因遺伝子を明らかにしていくことが可能であると考えられた。

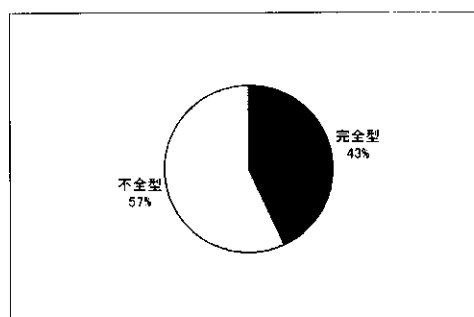
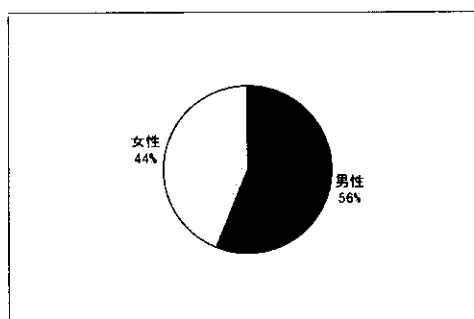
健康危険情報

特になし

表1

検体収集状況		
横浜市立大学		80
ゆあさ眼科		33
ベーチェット病友の会	静岡支部	12
ベーチェット病友の会	神奈川支部	21
ベーチェット病友の会	全国総会	27
ベーチェット病友の会	石川支部	30
ベーチェット病友の会	大阪支部	26
ベーチェット病友の会	埼玉支部	3
ベーチェット病友の会	山形支部	6
ベーチェット病友の会	福島支部	6
総計		244

表2



厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

ベーチェット病における MICA 多型性領域を認識する HLA-B51
拘束性 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 講師
研究協力者 安岡秀剛 慶應義塾大学医学部内科 助手

研究要旨

ベーチェット病と関連する遺伝素因として HLA-B51 と MICA*009（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、これらがベーチェット病の病態に関わる機序はいまだ明らかではない。我々は昨年度までの本研究班で、MICA-A6 部分ペプチドを認識する T 細胞が B51 陽性ベーチェット病患者の疾患活動期に検出されることを報告した。そこで、本年度は MICA-A6 反応性 T 細胞株の HLA 拘束性と細胞傷害活性について検討した。B51 陽性のベーチェット病患者末梢血 T 細胞を自己抗原提示細胞と IL-2 存在下で A6 ペプチドにより反復刺激し、MICA-A6 反応性 T 細胞株を樹立した。これら T 細胞株は A6 ペプチドをパルスした B51 遺伝子導入 B 細胞株あるいはペプチドなしの B51 と MICA*009 の両遺伝子を導入した B 細胞株を認識し、この反応は抗 HLA クラス I 抗体により完全に抑制された。さらに、MICA-A6 反応性 T 細胞株は A6 ペプチド存在下で B51 陽性細胞を傷害した。以上より、MICA に対する自己反応性 T 細胞は B51 拘束性に MICA の多型性領域を認識し、MICA を発現する上皮や血管内皮細胞を傷害することで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素因として古くから HLA-B が知られていたが、近年 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の新たな関連が報告された¹⁾。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ライト (MICA-A6) をもつ MICA*009 が健常人に比べて有意に高頻度となる。MICA 分子は主に腸管上皮に存在する Vδ1 陽性 T 細胞の T 細胞レセプターのリガンドであるとともに、キラー活性を有するリンパ球の細胞膜表面に発現してキラー活性増強を誘導する NKG2D 分子のリガンドである²⁾³⁾。

MICA 分子の発現はベーチェット病における病変好発部位である皮膚、粘膜上皮（眼ぶどう膜、口腔、腸管など）、血管内皮に限局している。また、ベーチェット病患者の病変部位で CD8⁺T 細胞などのキラー活性を有する細胞の増加が報告されている。これらの知見は MICA 分子とベーチェット病の病態との関連を示唆する。そこで、我々はベーチェット病の病態に MICA 分子に対する自己免疫応答が存在する可能性を想定し、検討してきた。昨年度までの本研究班における研究成果から、MICA の膜貫通領域の A6 マイクロサテライト領域を含むペプチド（A6 ペプチド）を認識する T 細胞が B51 陽性の活動期ベーチェット病患者に特異的に検出され、病勢の寛解とともに消失することを見出した。本年度は、ベーチェット病の病態における MICA-A6 反応性 T 細胞の役割をさらに検討するため、MICA-A6 反応性 T 細胞の HLA 拘束性と細胞障害活性について検討した。

B. 研究方法および対象

1. 対象

厚生労働省研究班の診断基準を満たすベーチェット病患者のうち、これまで A6 ペプチドに対する T 細胞の反応の得られた 4 例を対象とした。全例が B51 陽性であった。

2. A6 ペプチド反応性 T 細胞株の樹立

MICA 膜貫通領域の A6 部分を含む 9-mer ペプチド（A6 ペプチド; AAAAAIFVI）の刺激による T 細胞株の樹立は既報の方法に従った⁴⁾。すなわち、末梢血単核球を 2 μg/ml の A6 ペプチドおよび IL-2 存在下で培養し、一週間ごとに 2 回ペプチドでバル

スした自己抗原提示細胞（APC）による刺激を繰り返すことで T 細胞株を樹立した。T 細胞株の A6 ペプチドに対する反応性は、A6 ペプチドまたは MICA の多型性のない領域の対照ペプチド（GKDLRMTL）をパルスした自己 APC との 24 時間の培養後に上清中に産生された IFN-γ 濃度を測定することで調べた。APC として凍結末梢血単核球または EB ウイルスでトランスフォームした B 細胞株を用いた。A6 ペプチド存在下で IFN-γ を産生するが、対照ペプチドに対して反応しない T 細胞株を MICA-A6 反応性 T 細胞株とした。

3. T 細胞の抗原認識機構の解析

MICA-A6 反応性 T 細胞株の抗原認識機構を様々な APC との 24 時間培養後の上清中の IFN-γ 濃度により検討した。APC として自己 APC に加えて、HLA-A、B を欠く B 細胞株 C1R および HLA-B51 遺伝子を導入した C1R（C1R/B51）、HLA-B51 と MICA*009 の両遺伝子を導入した C1R（C1R/B51/MICA）を用い、A6 ペプチド存在あるいは非存在下で T 細胞株と共培養した。また、HLA 拘束性を確認するため、T 細胞株と APC との共培養開始時に抗 HLA クラス I、抗 HLA-DR、抗 HLA-DQ、抗 HLA-DP 抗体（2 μg/ml）を添加した。

4. T 細胞の細胞傷害活性の検討

MICA-A6 反応性 T 細胞株を ⁵¹Cr で標識した C1R/B51 を標的細胞として A6 ペプチド存在および非存在下で 24 時間共培養し、培養上清中に遊離した放射活性（cpm）を測定した。最大解離は 0.5% TritonX-100 添加により求めた。

(倫理面への配慮)

すべての患者検体は学内の倫理委員会で承認された文書によるインフォームドコンセントを得た上で提供を受けた。

C. 研究結果

図 1 に活動期ベーチェット病患者から樹立した MICA-A6 反応性 T 細胞株の抗原特異性を検討した代表的な結果を示す。A6 ペプチドの反復刺激により得られた T 細胞株は自己 APC と A6 ペプチド存在下で IFN- γ を産生したが、対照ペプチドに対して反応しなかった。また A6 ペプチドにより誘導された T 細胞からの IFN- γ 産生は抗 HLA クラス I 抗体で完全に抑制されたが、HLA クラス II に対する抗体により影響を受けなかった。さらに MICA-A6 反応性 T 細胞の抗原認識が HLA-B51 拘束性であることを確認するため、C1R/B51 および C1R/B51/MICA を APC として用い、MICA-A6 反応性 T 細胞の反応を誘導できるかを検討した (図 2)。MICA-A6 反応性 T 細胞株は A6 ペプチドをパルスした C1R に対して反応しなかったが、C1R/B51 を APC として用いると A6 ペプチド存在下で IFN- γ を産生した。この反応も抗 HLA クラス I 抗体で抑制されたことから、T 細胞株は B51 分子上に提示された A6 ペプチドを認識すると考えられた。さらに、A6 ペプチドを 1 μ M から 10⁻³ μ M まで段階的に希釈し、T 細胞株の反応性を検討すると、10⁻² μ M ときわめて低濃度まで T 細胞株からの IFN- γ 産生が誘導された。

次に、MICA-A6 反応性 T 細胞株を A6 ペプチド存在および非存在下で C1R/B51/MICA と共培養したところ、A6 反応性 T 細胞は外因性の A6 ペプチドの存

在とは無関係に反応した (図 2)。この反応も抗 HLA クラス I 抗体で抑制されたことから、A6 ペプチドは APC である C1R で強制発現させた MICA*009 分子からのプロセッシングにより作られ、B51 分子表面上に提示されたと考えられた。

MICA-A6 反応性 T 細胞株が細胞傷害活性を有するかを検討するため、⁵¹Cr で標識した C1R/B51 を標的とした ⁵¹Cr 放出アッセイを行った。その結果、MICA-A6 反応性 T 細胞株は A6 ペプチド存在下で標的細胞を傷害した。

D. 考察

MICA の膜貫通領域のマイクロサテライト配列を含む A6 ペプチドに対する T 細胞の反応性は B51 陽性のベーチェット病患者の疾患活動期に限って検出される⁴⁾。A6 ペプチドは HLA クラス I 分子に対する結合親和性を予測するプログラムで B51 に高親和性に結合することが推測されていたが、今回の結果から実際に B51 分子に結合して膜表面に提示されることが示された。また、B51 および MICA*009 を強制発現させた B 細胞株を用いた実験系で、MICA*009 分子からのプロセッシングにより A6 ペプチドが作られることも確認された。A6 ペプチドは 10⁻² μ M の低濃度でも APC 存在下で MICA-A6 反応性 T 細胞株の反応を誘導したことから、in vitro での高濃度のペプチド刺激で誘導された artifact とは考えずらい。以上の成績から、MICA-A6 を認識する CD8⁺T 細胞が B51 陽性ベーチェット病患者の炎症性病態に関与していると考えられ、ベーチェット病の発症に HLA-B51 と MICA-A6 の両者の組み合わせが重要と思われる。ただし、両者

の間には強い連鎖不平衡があり、これら 2 つの遺伝素因が独立して働くことはない。

これまで、ベーチェット病で病態と直接関連する T 細胞として Hsp60/65 などに対する T 細胞が報告されているが、いずれも CD4⁺であり、疾患感受性遺伝子である HLA-B51 に拘束された CD8⁺T 細胞の報告はない。今回、ベーチェット病患者で B51 分子に提示され T 細胞の活性化を誘導する自己抗原として MICA が初めて同定された。また、本研究成果は自己反応性 T 細胞がベーチェット病の病態に関与することを示唆し、ベーチェット病が自己免疫疾患として把握できる可能性が考えられる。

今回ベーチェット病患者から樹立した MICA-A6 反応性 T 細胞が細胞傷害活性を有することが示され、これら T 細胞が *in vivo* で MICA 発現細胞を傷害する可能性が高い。MICA 分子の発現は上皮細胞、血管内皮細胞、ケラチノサイトなどに限られ⁵⁾、ベーチェット病にみられる病変分布と一致する。また MICA 分子の発現は、熱などのストレスにより誘導され⁶⁾、ベーチェット病患者における臨床症状の悪化が細菌感染や機械的な刺激により誘導される知見とも一致する。MICA 分子は外界と接する皮膚や粘膜の細胞でストレスにより発現誘導され、傷ついた細胞が $\gamma\delta$ 細胞をはじめとしたキラー活性を有する T 細胞により認識、除去される際の目印と考えられている⁷⁾。したがって、ベーチェット病の病態は、ストレスで傷ついた外界と接する細胞の処理が、自己免疫反応により過剰となった状態と理解することもできる。すなわち、B51 と MICA-A6 を併せ持つベーチェット病患者では、通常の MICA を介した傷害細胞の

処理機構のみならず B51 に拘束された MICA-A6 部分を認識する CD8⁺細胞傷害性 T 細胞も加わることで免疫応答が増強される。この仮説については今後のさらなる検証が必要であるが、ベーチェット病の病因、病態を解明する上で重要な知見と考えられる。

E. 結論

ベーチェット病患者末梢血中の MICA-A6 の膜貫通領域を認識する T 細胞は B51 拘束性で、細胞障害活性を有していた。これら自己反応性 T 細胞がベーチェット病の炎症性病態と関連する可能性が示された。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

<引用文献>

- 1) 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's disease. *Proc Natl Acad Sci* 94: 1298-1303, 1997.
- 2) Groh V, Steinle A, Bauer S et al. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial $\gamma\delta$ T cells. *Science* 279: 1737-1740, 1998.
- 3) Bauer S, Groh V, Wu J et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285: 727-729, 1999.
- 4) 桑名正隆、安岡秀剛、河上裕. 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. 厚生科学研究パーチャット病に関する研究平成 13 年度研究報告書, 2002; pp34-38.

- 5) Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE et al. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. Proc Natl Acad Sci USA 91: 6259-6263, 1994.
- 6) Groh V, Bahram S, Bauer S et al. Cell-stress regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. Proc Natl Acad Sci USA 93: 12445-12450, 1996.
- 7) Hagmann M. A trigger of natural (and other) killers. Science 285: 645-646, 1999.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshida K, Arai T, Kaburaki J, Ikeda Y, Kawakami Y, Kuwana M: Restricted T cell receptor β -chain usage by T cells autoreactive to β 2-glycoprotein I in patients with antiphospholipid syndrome. Blood 99: 2499-2504, 2002.
- 2) Kuwana M. Induction of anergic and regulatory T cells by plasmacytoid dendritic cells and other dendritic cell subsets. Hum Immunol 63: 1156-1163, 2002.

- 3) Kuwana M, Kawakami Y, Ikeda Y. Suppression of autoreactive T-cell response to glycoprotein IIb/IIIa by blockade of CD40/CD154 interaction: implications for treatment of immune thrombocytopenic purpura. Blood 101: 621-623, 2003.
- 4) 桑名正隆: 膠原病の病態と自己抗原反応性T細胞. アレルギー・免疫 9: 40-46, 2002.

2. 学会発表

- 1) 桑名正隆: リウマチ性疾患における病因的自己反応性 CD4⁺T 細胞と樹状細胞を用いたその人為的制御. 第 46 回日本リウマチ学会総会(神戸). 2002 年 4 月
- 2) 桑名正隆: 自己免疫疾患の発症機序と自己反応性 T 細胞を標的とした免疫療法. 第 32 回日本免疫学会総会(東京). 2002 年 12 月

H. 知的所得権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

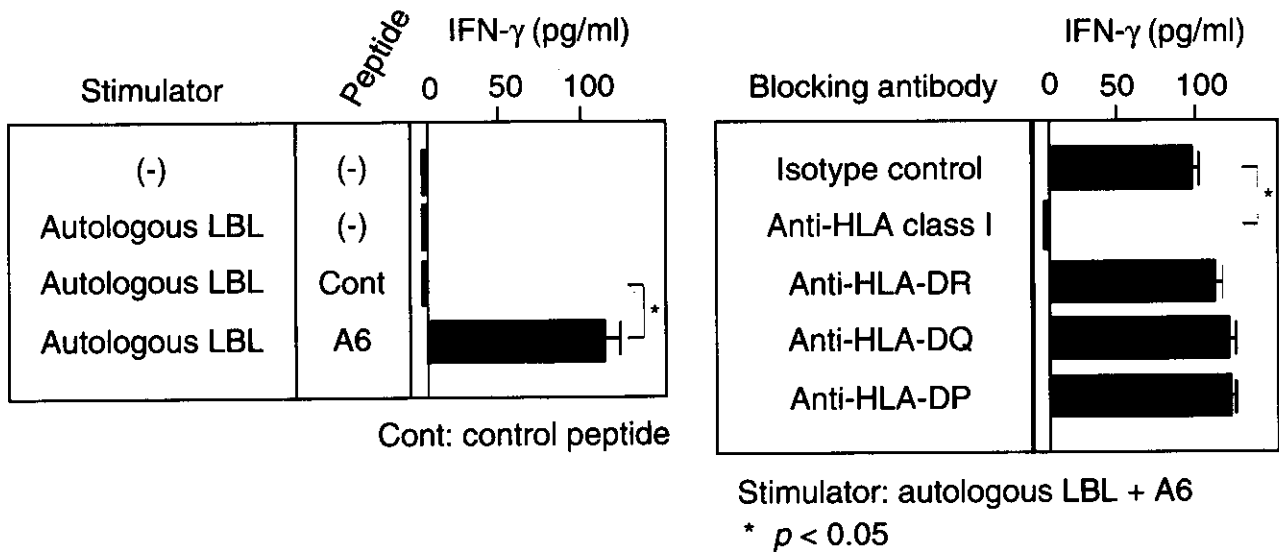


図1. 活動期パーチェット病患者から樹立したMICA-A6反応性T細胞株の抗原特異性

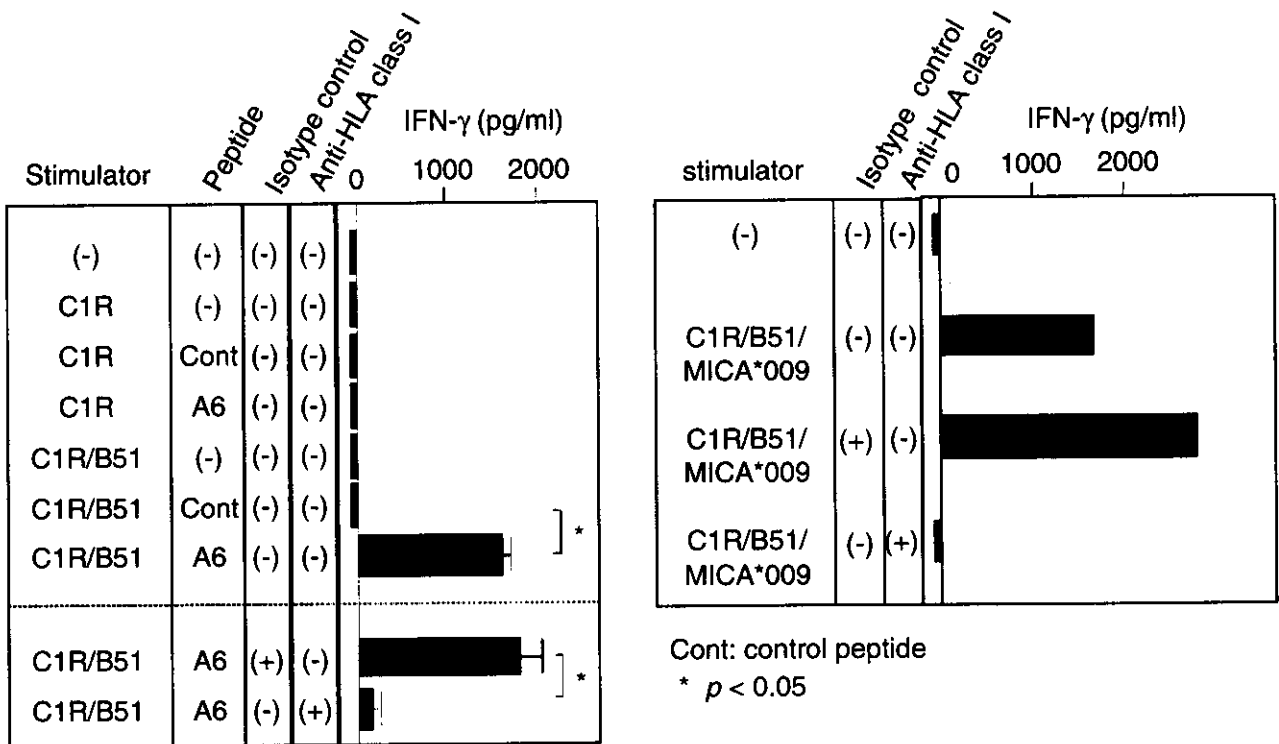


図2. C1R、C1R/B51、C1R/B51/MICAをAPCとして用いたMICA-A6反応性T細胞株のB51拘束性の解析

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

ベーチェット病に関する調査研究

ベーチェット病におけるウイルス感染の病因的意義についての研究

分担研究者 岩月啓氏 岡山大学大学院医歯学研究科皮膚・粘膜・結合織学 教授

研究要旨:ベーチェット病の病因としてウイルス感染もその一つとして考えられている。今回、臨床的に単純ヘルペス感染症の合併についての検討と皮膚・粘膜病変部、うがい液にからヘルペスウイルスについて遺伝子・免疫組織化学的に検討した。結果は単純ヘルペスの合併頻度は少なく、皮膚病変部においても免疫組織、in situ hybridization ではヘルペスウイルスはすべて陰性であった。また、うがい液からのウイルス DNA (HSV-1, HSV-2, CMV, EBV, HHV-6, HHV-7) の検出頻度は健常人と比較し有意差は認められなかった。今回の検討ではベーチェット病の病因とウイルスの関与は明らかにならなかった。

分担研究者 岩月啓氏 (岡山大学大学院医歯学総合研究科皮膚・粘膜・結合織学)

共同研究者:山崎修、森実真、瀬津名美子、大野貴司 (岡山大学大学院医歯学総合研究科皮膚・粘膜・結合織学)

A. 研究目的

ベーチェット病の病因については明らかにされていないが、ウイルスも病因の一つとして考えられている。ベーチェット病のウイルス感染の関与について考察する目的で、皮膚・粘膜病変部、うがい液についてヘルペスウイルスについて遺伝子・免疫組織化学的に検討する。

B. 研究方法

①岡山大学医学部附属病院皮膚科通院中のベーチェット病患者 24 人について、経過中の単純ヘルペスの合併について検討した。

②ベーチェット病患者の病変部 (皮膚・粘膜部) のパラフィン切片より HSV-1, HSV-2, CMV で免疫染色した。EBV は in situ

hybridization (ISH) によりウイルス DNA の検出を行った。

③岡山大学医学部附属病院および関連病院皮膚科を通院中のベーチェット病患者のうがい液より DNA を抽出し、PCR 法で HSV-1, HSV-2, CMV, EBV, HHV-6, HHV-7 を検索し、免疫抑制患者、健常人コントロールと比較検討した (n=15~20)。免疫抑制患者は膠原病・自己免疫性水疱症にて副腎皮質ホルモンを長期間服中の患者とした。

(倫理面への配慮)

DNA の抽出を行ううがい液については研究目的、研究方法を十分説明し、同意を得たうえで提供していただいた。また、プライバシーの保護のため、データについては厳重に管理した。

C. 研究結果

①ベーチェット病患者 24 例中単純ヘルペスの合併は 2 例 (4%) に認めた。その合併とベーチェット病の病勢とは一致しなかった。

②結節性紅斑 10 例、外陰部潰瘍 4 例、口内炎 3 例、毛嚢炎様皮疹 5 例において、免疫染色

は HSV-1, HSV-2, CMV がすべて陰性。In situ hybridization は EBV がすべて陰性であった。

(表 1)

③ベーチェット病患者のうがい液よりウイルス DNA 検出のパターンは免疫抑制患者、健常人コントロールと有意差は認められなかった。

(表 2)

D. 考察

ベーチェット病の病因は明らかではないが、古くよりウイルスとの関連は報告されており、近年、分子細胞学的手法が確立されて以来、ウイルスとの関連が再認識されている。ベーチェット病患者の粘膜病変^{1,2)}や唾液³⁾から単純ヘルペスウイルス DNA が健常人より有意に検出された報告や、単純ヘルペスウイルスを接種しベーチェット病類似の動物モデルを作製した報告^{4,5)}があり、他のヘルペスウイルスとして EBV⁶⁾、CMV⁷⁾との関連を指摘した報告も散見される。

しかしながら、われわれの検討のように臨床的には単純ヘルペス感染症の合併はすくなく、病勢とも一致しない。本班会議でもウイルスとの関連を検討した報告があるが、皮膚病変部ではウイルス DNA は検出されていない⁸⁾。

文献的に健常人の唾液やうがい液でヘルペスウイルスを検出した報告⁹⁻¹¹⁾は少なく、また PCR の方法や年齢層でも異なるが、われわれの検出率が範囲内に入っており、文献的にも BD 病患者のウイルス DNA の検出率は有意なものではないと言える。

E 結論

ヘルペスウイルスについては、ベーチェット病とコントロール群では、検出されるウイル

ス DNA には有意差はなかった。また皮膚・粘膜病変部でも検出されなかった。我々の検討ではベーチェット病の病因の外的因子としてウイルスの関与は明らかではなかった。今後は、ウイルス感染とその免疫反応についての検討が必要と思われた。

F. 研究発表

ベーチェット病に関する調査研究：平成 14 年度第 2 回班会議 (H15.1.17.福島)

参考文献

- 1) Studd M, McCance DJ, Lehner T: Detection of HSV-1 DNA in patients with recurrent oral ulcers by polymerase chain reaction. *J Med Microbiol* 1991; 34: 39-43.
- 2) Nomura Y, Kitteringham N, Shiba K, Goseki M, Kimura A, Mineshita S: Use of the highly sensitive PCR method to detect the Herpes simplex virus type 1 genome and its expression in samples from Behcet disease patients. *J Med Dent Sci* 1998; 45: 51-8.
- 3) Lee S, Bang D, Cho YH et al: Polymerase chain reaction reveals herpes simplex virus DNA in saliva of patients with Behcet's disease. *Arch Dermatol Res* 1996; 288: 179-83.
- 4) Sohn S, Lee ES, Bang D, Lee S: Behcet's disease-like symptoms induced by herpes simplex virus in ICR mice. *Eur J Dermatol* 1998; 8: 21-23.
- 5) Sohn S, Bang D, Lee ES, Kwon HJ, Lee SI, Lee S: Experimental studies on the antiviral agent famciclovir in Behcet's disease symptoms in ICR mice. *Brit J Dermatol* 2001; 145: 799-804.

- 6) Sun A, Cgong JG, Chu CT, Liu BY, Yuan JH, Chiang CP: Preliminary evidence for an association of Epstein-Barr virus with preulcerative oral lesions in patients with recurrent aphthous ulcers or Behcet's disease. *J Oral Pathol Med* 1998; 27: 168-75.
- 7) Sun A et al: Human cytomegalovirus as a potential etiologic agent in recurrent aphthous ulcers and Behcet's disease. *J Oral Pathol Med* 1996; 25: 212-8
- 8) 金子史男、東條理子、佐久間陽子：ペーチェット病患者の連鎖球菌過敏反応とウイルス感染の関与について。厚生科学研究（特定疾患対策研究事業）ペーチェット病に関する研究，平成 12 年度研究報告書。116-118, 2001. Broccolo F, Bossolasco S, Careddu AM, Tambussi G, Lazzarin A, Cinque P: Detection of DNA of lymphotropic herpesviruses in plasma of human immunodeficiency virus-infected patients: frequency and clinical significance. *Clin Diag Lab Immunol* 2002; 9: 1222-8.
- 10) Fujiwara N, Namba H, Ohuchi R, Isomura H, Uno F, Yoshida M, Nii Shiro, Yamada M: Monitoring of human herpesvirus-6 and -7 genomes in saliva samples of healthy adults by competitive quantitative PCR. *J Med Virol* 2000; 61: 208-213.
- 11) Ikuta K, Satoh Y, Hoshikawa Y, Sairenji T: Detection of Epstein-Barr virus in salivas and throat washings in healthy adults and children. *Micro Infect* 2000; 2: 115-120.

表1 Detection of herpesviruses DNA in throat washings

Diagnosis	No. of patients	No.(%) positive for					
		HSV-1	HSV-2	CMV	EBV	HHV-6	HHV-7
Normal host	20	1(5)	1(5)	7(35)	10(50)	6(30)	13(65)
Immunosuppressed host	20	2(10)	0	4(20)	17(85)	3(17)	9(45)
Behcet's disease	15	0	0	6(40)	9(60)	4(27)	11(73)
Total	55	3(5)	1(2)	17(31)	36(65)	12(22)	33(60)

表2 Immunohistochemistry and in situ hybridization

	total	HSV-1	HSV-2	CMV	EBV(EBER)
aphtha	5	0	0	0	0
acne-like eruption	4	0	0	0	0
erythema nodosum	11	0	0	0	0
genital ulcer	3	0	0	0	0

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

ベーチェット病に関する調査研究

ベーチェット病における BES-1 蛋白由来のペプチドに関する研究

分担研究者 小林和人 福島県立医科大学
生体情報伝達研究所生体機能研究部門教授
共同研究者 柳堀浩克 福島県立医科大学 皮膚科学講座
東條理子 福島県立医科大学 皮膚科学講座
中村晃一郎 福島県立医科大学 皮膚科学講座
磯貝恵美子 北海道医療大学歯学部口腔衛生学講座

研究要旨 ベーチェット病 (BD) は従来 HLA-B51 抗原との相関が知られており、HLA-B51 遺伝子、またはその近傍の遺伝子群 (MICA、MICB) が BD の発症に関与すると考えられている。さらにこれら、遺伝的背景をもとに様々な環境要因や外的因子 (*Streptococcus sanguis*、human herpes virus など) が BD 発症に重要な役割を果たしている事が知られており、将来的に MICA、MICB、HLA-B51 トランスジェニックマウス (Tg) に外的因子を付加する事でさらなる病態解明が期待される。今回我々は BD 外的因子候補とされる *S. sanguis* の BD 発症に関わる抗原を明らかにする目的で Bes-1 抗原に注目した。BD 患者の口腔内から分離された *S. sanguis* KTH-1 株より同定された Bes1 抗原は、網膜関連抗原 Brn3b と相同性領域を有する。今回、我々はこの相同性領域に対する合成ペプチド (BES1-1:AFIVPHGGHFHYIPK、BES1-2:HGDHHHFIPYDKL、Brn3b-1:AFSMPHGGSLHVEPK、Brn3b-2:HHHHHHHQP HQAL) と患者血清 15 例、健常人血清 13 例を用いて ELISA 法で解析を行った。それぞれのペプチドに対する血清 IgG 値について分散分析を行ったところ、BD 群では健常人群に比べやや高値の傾向を示した。

A.背景：これまで BD の発症の契機になるという外的要因として溶連菌の関与が指摘されている。我々も以前より溶連菌抗原の皮内テストにより BD 患者が強陽性を示すこと、また口腔内から遠隔の結節性紅斑部位にも溶連菌抗原が検出されることを報告した¹。その後 BD 患者口腔内より BD 患者特有の *S.sanguis*

KTH-1 株が分離され、そこから新規の溶連菌関連抗原 Bes 1 が同定された²。我々は BD 患者皮膚病変において Bes1DNA 及び herpes virus DNA の検出を試み、これら病原微生物の皮膚病変部形成への関与を指摘してきた^{3,4}。これまで BD 患者において遺伝的に相関の明らかな HLA-B51 や連鎖不平衡にある MICA、

MICB のトランスジェニックマウスでは明らかな BD の発症を認めないことから BD 発症モデルマウスにはこれらの溶連菌関連抗原あるいは heat shock protein, herpes virus などの外的因子の負荷が必要である可能性が考えられる。

B.研究目的：今回我々は BD 外的因子候補とされる *S. sanguis* の中でも網膜関連抗原 Brn3b に相同性を示す Bes-1 抗原に注目し(図 1)、BD 患者の血清における Bes-1 抗原との抗体応答について検討した。

C. 方法：ペプチド 4 種類 (BES1-1:AFIVPHGGHFHYIPK、BES1-2:HGDHHHFIPYDKL、Brn3b-1:AFSMPHGGSLHVEPK、Brn3b-2:HHHHHHHQP HQAL) をコーティングした ELISA プレートを作成し、BD 患者 11 名 (男性 4 名、女性 7 名)、健常人 15 名 (男性 10 名、女性 5 名) の血清を反応させ、それぞれのペプチドに対する血清 IgG 値について解析した。

D.結果：BES1-1 では BD と健常人間で BD 群がやや高値傾向を示すものの、有意差は認められなかった。Brn3b-1、Bes1-2、Brn3b-2 同様に BD 群がやや高値傾向を示すものの、有意差は認められなかった (図 2)。

E.考察：今回は BD 患者 11 名のうち、活動期の血清が 2 症例と少なく比較検討する事ができなかったため、今後は検体数を増やす事で病勢、眼症状、HLA-B51

などの違いによるより詳細な解析を行う必要があると考えられる。

F.研究発表：ベーチェット病に関する調査研究平成 14 年度第 2 回研究会 (H15.1.17 福島)

G.文献

- 1) Kaneko F, Takahashi Y, Muramatsu Y, Miura Y. Immunological studies on aphthous ulcer and erythema nodosum-like eruption in Behcet's disease. *Br J Dermatol* 1985;113:303-12
- 2) Yoshikawa K, Kotake S, Kubota T, Kimura K, Isogai E, Nobuhiro F. Cloning and sequencing of Bes-1 gene encoding the immunogenic antigen of *Streptococcus sanguis* KTH-1 isolated from the patients with Behcet's disease. *Zent bl Bakteriologie* 1998;287:449-60.
- 3) Tojo M, Yanagihori H, Zheng X, Oyama N, Isogai E, Nakamura K, Kaneko F. Detection of microbial DNA in skin lesions from patients with Behcet's disease. *BEHCET'S DISEASE: Proceeding of the 10th international conference on Behcet's disease 2002*; in press
- 4) Tojo M, Zheng X, Yanagihori H, Oyama N, Takahashi K, Nakamura K, Kaneko F. Detection of herpes virus genomes in skin lesions from patients with Behcet's disease and other related inflammatory diseases. *Acta Derm Venereol* 2003; 83: 1-4

図の説明

BES-1 と Brn-3b のアミノ酸配列相同性	
Identities=9/15 (60%), Positives=10/15 (66%)	
BES-1	229 AFTVPHGGHFHYIPK 243
Brn-3b	11 AFSMPHGGSLHVEPK 25
Identities=6/13 (46%), Positives=7/13 (53%)	
BES-1	373 HGDHHHFIPYDKL 385
Brn-3b	177 HHHHHHHQPHQAL 189
Yoshikawa K, Isogai E, et al. Zent bl Bakteriol, 1998	

図 1 : Bes1 とヒト網膜関連抗原 Brn3b とのアミノ酸配列相同性。Bes1 のアミノ酸配列からヒト網膜関連抗原である Brn3b との相同性が示され、相同性の高い2カ所のアミノ酸配列から4つのペプチドを合成し、ELISA プレートを作成した。

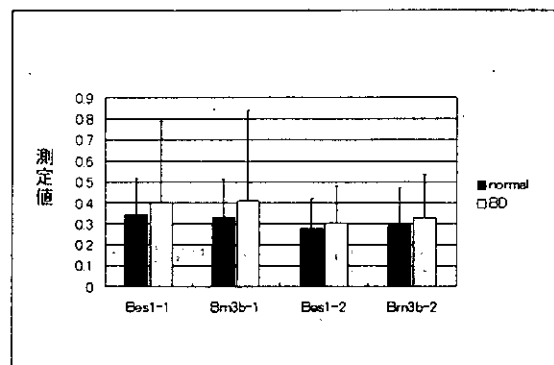


図 2 : それぞれのペプチドで BD 群がやや高値傾向を示すものの、有意差は認められなかった。

厚生省研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

（分担）研究報告書

HSP60 蛋白質の疾患発症における意義について
—患者由来口腔レンサ球菌の HSP 60 遺伝子の全塩基配列の決定—

分担研究者 小熊恵二 岡山大・大学院医歯学総合研究科・病原細菌学 教授
共同研究者 横田憲治 岡山大・大学院医歯学総合研究科・病原細菌学
林 松男 岡山大・大学院医歯学総合研究科・病原細菌学
阪口義彦 岡山大・大学院医歯学総合研究科・病原細菌学
関 鋭 岡山大・大学院医歯学総合研究科・病原細菌学
磯貝恵美子 北海道医療大・歯・口腔衛生
山崎 修 岡山大・大学院医歯学総合研究科・皮膚・粘膜・結合組織学
岩月啓氏 岡山大・大学院医歯学総合研究科・皮膚・粘膜・結合組織学

研究要旨

ベーチェット病（B. D）および川崎病患者由来各種口腔レンサ球菌の熱ショック蛋白質（HSP60）のアミノ酸配列の相同性を解析した後、HSP 全体および興味ある6種類のペプチドを作製し、疾患との関係を解析している。

A. 研究目的

ベーチェット病（B. D）の発症に、ストレプトコッカス属およびその熱ショック蛋白質（HSP）が関与していることが推察されている。B. D および川崎病患者より分離した各種の口腔レンサ球菌の HSP60 のアミノ酸配列の相同性を解析し、興味深いと推察される6種類のペプチドを作製し、疾患発症との関係を解析する。

B. 研究方法

B. D 患者由来株（113 - 20、114 - 23、118 - 1）と川崎病患者由来株（MCLS - 1、MCLS - 2）および基準株（ATCC10556、10557、10558、7073）の HSP60 遺伝子の塩基配列を決定した。まず、*S. pyogenes hsp60* の塩基配列をもとに作製したプライマ

ーと各種の菌のゲノム DNA との間で PCR を行い、*hsp60* の大部分の塩基配列を決定した。次いで、この領域の塩基配列をもとにプライマーを作製し、菌のゲノム DNA に対する inverse PCR を行い、*hsp60* の両端および上流、下流領域の塩基配列を決定した。

リコンビナント HSP は、113-20 の HSP 遺伝子を pGEX-6P-3 ベクターを介して大腸菌に導入し、GST 融合タンパク質として発現させた後、Glutathione-Sepharose 4B, PreScission protease を用いて単離・精製して得た。また、6 種類のペプチド（各 15～20 アミノ酸残基）を人工合成した。これらを抗原として、患者血清との間で ELISA を行った。

C. 研究結果

S. sanguis 113-20 株 *hsp60* の ORF は、1,623 bp でありこの遺伝子がコードするタンパク質は 540 個のアミノ酸残基からなることが推定された。*S. sanguis* 113 - 20 株 HSP60 のアミノ酸配列は、MCLS - 2、114 - 23、MCLS - 1、118 - 1、および3種の基準株とは高い相同性を示した（99～92%）。*S. pyogenes*、*S. agalactiae* とは約 87 %、ブドウ球菌とは約 70 %、グラム陰性桿菌およびグラム陽性桿菌とは 50 - 60 %、ヒトの HSP60 とは約 50 % であった（表 1, 2）。これらのアミノ酸配列のアライメントを比較すると、多くの細菌とヒトの間で共通の部分、およびストレプトコッカスとヒトの間でのみ相同性が高い部分が、それぞれ 3 個ずつ存在することが明らかとなった（図 1）。*S. sanguis* 113-20 株 HSP60 の 1 次構造の T 細胞エピトープを考慮し、ストレプトコッカスとヒトの HSP60 の間でのみ相同性が高い部分 3 種類（LO-1, 2, 3 と命名）、多くの細菌とヒトで共通の部分 2 種類（III-a, b と命名）、既に英国などで病原性に関与していると発表されている部分（UK と命名）の計 6 種類のペプチド、およびを合成した（図 2, 表 3）。現在、これらと別途合成したリコンビナント *S. sanguis* 113 - 20 株の HSP60 を用い、患者血清との反応性を検討している。

D. 考察

B. D 患者、川崎病患者由来株および基準株の HSP60 は高い相同性を示したが、大腸菌やヒトの HSP60 などとは 50~60%であった。多くの細菌とヒトの HSP60 の間で共通の部分、およびストレプトコッカスとヒトの HSP60 の間でのみ相同性が高い部分が、それぞれ3個ずつ存在することが明らかとなったので、これらの部分のペプチドを作製した。現在、これらと患者血清との反応性を検討しているが、まだ検体数が少なく統計学的に判定できない。今後、数を増やすと共に、末梢リンパ球との反応も観察する予定である。

E. 研究発表

学会発表

1) 藏内智己、松尾俊彦、大月 洋、横田憲治、小熊恵二 連鎖球菌抗原刺激に対するベーチェット病患者末梢血の反応性 第 105 回日本眼科学会総会 日本眼科学会雑誌 臨時増刊 105:154 2001
2001年4月19日~21日 横浜

2) 林 松男、阪口義彦、関 鋭、藤浪良仁、横田憲治、磯貝 浩、磯貝恵美子、小熊恵二 *Streptococcus sanguis* 熱ショック蛋白質 60 遺伝子の塩基配列の決定とその発現 第 75 回 日本細菌学会総会 日本細菌学雑誌 57(1):128 2002
2002年4月3日~5日 横浜

3) 横田憲治、林 松男、小熊恵二、磯貝恵美子 口腔内連鎖球菌抗原刺激に対するベーチェット病患者末梢血の反応性の検討 第 11 回 Lancefield レンサ球菌研究会 プログラム・抄録 16、2002
2002年6月1日~2日 徳島

4) Lin Song-Nan, Yoshihiko Sakaguchi, Kan Rui, Yoshihito Fujinami, Kenji Yokota, Hiroshi Isogai, Emiko Isogai, and Keiji Oguma Whole aminoacid sequence of HSP60 produced by oral streptococcus strains isolated from patients with Behçet