

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

# ベーチェット病に関する調査研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 金子 史男

平成16年（2004）年 3月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

ベーチェット病に関する調査研究

平成 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 金子 史男

平成 16 年 (2004) 年 3 月

## 目 次

I 班員名簿	1
II 総括研究報告	
ヘーチュノト病に関する調査研究	3
主任研究者 金子史男 (福島県立医科大学医学部皮膚科学)	
III 分担研究報告	
ヘーチュノト病はどのようなルートで日本にもたらされたか	9
分担研究者 猪子英俊 (東海大学医学部分子生命科学系遺伝情報部門)	
ゲノムワイトなマイクロサライトマノヒンクによるヘーチュノト病の原因 遺伝子の検索に関する研究	18
分担研究者 水木信久 (横浜市立大学大学院医学研究科視覚器病態学)	
ヘーチュノト病患者より分離されたレンサ球菌の同定	21
分担研究者 磯貝吉美子 (北海道医療大学歯学部口腔衛生学)	
ヘーチュノト病における連鎖球菌 HSP 由来のヘプチトに関する研究	25
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)	
細菌抗原と疾患発症における意義について	27
分担研究者 小能恵二 (岡山大学大学院医歯学総合研究科病原細菌学)	
ヘーチュノト病の病態形成における Th1 細胞の関与に関する研究	31
分担研究者 鈴木 登 (聖マリアンナ医科大学免疫学 病害動物学)	
ヘーチュノト病患者末梢血における細胞傷害性 T 細胞の活性化レベルの検討	34
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細胞情報研究部門)	

微生物由来 CpG DNA に対するヘーチェノト病患者単核球の反応性の検討・ 研究協力者 佐藤由紀夫 (福島県立医科大学医学部内科学第二講座)	38
Behcet 病における IL-12p40 および IRF-1 プロモーター領域の遺伝子多型解析 分担研究者 金子史男 (福島県立医科大学医学部皮膚科学)	41
ヘーチェノト病における抗菌蛋白質 granulysin の関与についての研究 分担研究者 岩月啓氏 (岡山大学大学院医歯学総合研究科皮膚粘膜結合織学)	44
ヘーチェノト病における血清 IP-10 値の検索と表皮ケラチノサイトの STAT-1 転写調節因子の制御に関する研究 分担研究者 中村晃一郎 (福島県立医科大学医学部皮膚科学)	46
パン酵母マンナンに対するヘーチェノト病患者血清の反応性 一疾患コントロールとの比較 分担研究者 磯貝恵美子 (北海道医療大学歯学部口腔衛生学)	50
腸管ヘーチェノト病の診療実態—診療カイトライン作成に向けて— 分担研究者 石ヶ坪良明 (横浜市立大学大学院医学研究科病態免疫制御内科学)	55
ヘーチェノト病等のふとう膜炎に伴う続発性緑内障の統計的解析 分担研究者 川島秀俊 (さいたま赤十字病院)	60
難治性ヘーチェノト病に対する低用量ステロイド薬併用療法の長期成績 分担研究者 川島秀俊 (さいたま赤十字病院)	65
ヘーチェノト病におけるノクロスポリノ治療効果と遺伝的多型性 研究協力者 太田正穂 (信州大学医学部法医学)	71
難治性ふとう膜炎に対するステロイド徐放薬の眼内投与についての検討 分担研究者 大野重昭 (北海道大学大学院医学研究科視覚器病学)	76
実験的自己免疫性網膜ふとう膜炎後に誘導される制御性 T 細胞に関する研究 分担研究者 大野重昭 (北海道大学大学院医学研究科視覚器病学)	79

ヘーチェノト病の新しい治療標的の探索 . . . . .	82
分担研究者 小野江和則 (北海道大学遺伝子病制御研究所免疫生物分野)	
ヘーチェノト病における heme oxygenase (HO)-1 の発現とその病態への関与 . . . . .	89
分担研究者 石ヶ坪良明 (横浜市立大学大学院医学研究科病態免疫制御内科学)	
Alpha-melanocyte stimulating hormone の抗炎症効果に関する研究 . . . . .	93
分担研究者 大野重昭 (北海道大学大学院医学研究科視覚器病学)	
ヘーチェノト病全国疫学調査 . . . . .	95
研究協力者 稲葉裕 (順天堂大学医学部衛生学)	
ヘーチェノト病患者の口腔関連 QOL に関する研究 . . . . .	114
研究協力者 福原俊一 (京都大学大学院医学研究科医療疫学)	
IV 研究成果の刊行に関する一覧表 . . . . .	117
V 第 1 回班会議プログラム . . . . .	135
VI 第 2 回班会議プログラム . . . . .	139

# I 班員名簿

## へーチェノ病に関する調査研究班

<区分>	<氏名>	<所属>	<職名>
主任研究者	金子 史男	福島県立医科大学医学部皮膚科学	教授
分担研究者	大野 重昭	北海道大学大学院医学研究科視覚器病学分野	教授
	猪子 英俊	東海大学医学部分子生命科学系遺伝情報部門	教授
	小野江 和則	北海道大学遺伝子病制御研究所免疫生物分野	教授
	鈴木 登	聖マリアノナ医科大学免疫学・病害動物学	教授
	磯貝 恵美子	北海道医療大学歯学部口腔衛生学	助手
	桑名 正隆	慶應義塾大学医学部先端医学研究所細胞情報研究部門	講師
	石ヶ坪 良明	横浜市立大学大学院医学研究科病態免疫制御内科学	教授
	水木 信久	横浜市立大学大学院医学研究科視覚器病態学	教授
	川島 秀俊	さいたま赤十字病院眼科	第二眼科部長
	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組織学	教授
	小能 恵二	岡山大学大学院医歯学総合研究科病原細菌学	教授
	小林 和人	福島県立医科大学医学部附属生体情報伝達研究所 生体機能部門	教授
	中村 晃一郎	福島県立医科大学医学部皮膚科学	助教授
研究協力者	福原 俊一	京都大学大学院医学研究科医療疫学分野	教授
	佐藤 由紀夫	福島県立医科大学医学部内科学第二講座	教授
	太田 正穂	信州大学医学部法医学	講師
	稲葉 裕	順天堂大学医学部衛生学	教授
事務局	尾山 徳孝	福島県立医科大学医学部皮膚科学教室 〒960-1295福島県福島市光が丘1番地 TEL (024) 547-1309 FAX (024) 548-5412 E-mail bd-re-gr@fmu.ac.jp	講師

## Ⅱ 総括研究報告



厚生科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

総括研究報告書

ヘーチェノト病に関する調査研究

主任研究者 金子史男 福島県立医科大学医学部皮膚科学講座教授

研究要旨 平成15年度(2003年)に改訂されたヘーチェノト病診断基準をもとに診断されたヘーチェノト病(BD)患者の試料を用いて検討を行った。研究方法は前年度の方法を踏襲し、発展させて、BD患者の病因・病態の解析を行うとともに、新しい治療法の開発を行った。また、疫学調査では一時調査で回答のあった施設を二次調査対象として患者の数、予後、QOL調査の分析を開始した。一方では、口腔内アフタに対するQOL調査についても検討した。

BDでは内因子としてHLA-B\*5101遺伝子解析から本症が中東地域に発症し、東方に伝播した可能性が示された。発症外因子のひとつBD患者の口腔内細菌*S sanguis*は新しい分類には*S sanguinis*に属する。この菌と関連し、生体に出現するヒトHSP-60との相同部ペプチドはT細胞エピソード細胞と対応し、BD患者の末梢血単核球(PBMC)を刺激した。また、*Helicobacter pylori*由来のHSP-60により近いことが示唆された。BD病変部、PBMCには活動期にはCD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>T細胞、CD69<sup>+</sup>γδT細胞が増加し、ケモタキンスレセプターCCR5、CXCR3が亢進していた。BD患者の樹状細胞(DC)は微生物由来CpGDNAを加えると強いIL-8の産生を起しToll-like receptor(TLR)9の関与を示唆した。また、BD患者のTh1系反応によるTNF-α、IFN-γは細胞内のSTAT1を発現させた。

腸管BD患者についてはこれまでに比較的報告は少なく、その治療法については確立されていないため、治療カイトラインの作成が重要である。

新しい治療への挑戦ではステロイド剤使用の見直しと、眼内挿入法の効果とノクロスポリンの感受性に関する遺伝子の検討を行った。また、実験的自己免疫性ぶどう膜炎を通してその新しい治療法への試みが行われた。

## A 研究目的

平成 15 年(2003 年)度に改訂されたヘーチェント病診断基準をもとに、ヘーチェント病(以下 BD と略す)患者の病勢を見直し、昨年度までの研究方法を踏襲するとともに、発展させ、新しい観点から BD の病因・病態の解明を検討し、新しい治療法の確立を目標とした。

倫理面への配慮 研究推進に先立って、次のことに留意した。病因 病態に関する BD の発症内因子における遺伝子の検索、疫学、患者の予後と QOL 調査に関してはプライバシーの尊重に留意し、趣旨を十分説明した上で協力を求め、秘密は厳守した。BD 患者の検体を利用する場合には目的 方法を本人に説明し、同意を得た上で採取して実験に用いた。結果については秘密を厳守した。動物実験では詳細な計画を立て、最小限の動物を用いることとし、動物に余分な苦痛を与えないように留意した。

## B 研究方法

### I BD の病因・病態に関する研究

#### 1 発症内因子としての疾患責任遺伝子の検索

BD 患者では、HLA-B\*51 の近傍領域が疾患感受性遺伝子として推定されている。猪子らは昨年度に引き続き、日本人、イラン、トルコ、ヨルダン人からの血液から DNA を抽出し、HLA-A、B、C 遺伝子のハプロタイプを sequence based typing(SBT)法で HLA B\*5101 を選出、イントロンを含めて解析を進めた。日本人の遺伝子解析では全染色体、全ゲノムを対象として従来 SNP 法に対してゲノムワイドなマイクロサテライト(MS)について BD 患者の pooled DNA として MS マニピュレーション法にて測定した。

#### 2 発症外因子としての原因検索

1)BD 患者の口腔内では、健常人の細菌叢と異なり、Streptococcus(S)が増加しており、その多くは S sanguis が検出されている。最近、その S 属の分類が見直されている点から、これまで BD 患者から検出された S sanguis について、新分類に準じて再分類を試みた。

2)S sanguis 由来熱ショック蛋白(heat shock protein HSP) -65 とヒト反応性 HSP 60 の相同性塩基配列部ペプチドと BD 患者の T 細胞エピトープとの対応する各ペプチドによる反応性の検討を行った。

#### 3 BD 患者の免疫状態の検討

1) BD 患者の T 細胞と樹状細胞(dendritic cell, DC)の役割については、本症患者の免疫異常を知る上で重要である。しかも、活動期の患者では Th 1 タイプの炎症性サイトカインが過剰に産生されている。すなわち、Th 1 細胞を活性化するアジュバント作用を示す機序が働いていることから、微生物由来の CpG DNA に対する反応について検討し、細胞傷害性 T 細胞の活性の検討を行った。

2) T 細胞の病変部への遊走機序に関して、これまでに BD 患者では末梢血単核細胞(PBMC)中に CXCR3 陽性細胞の出現が明らかになって、病変部では Th 1 細胞の浸潤が優位な状態になっている。この機序について培養表皮細胞を用いて Th 1 細胞からの interferon(IFN)  $\gamma$  および IP-10 による細胞内伝達の活性化経路である signal transducer and activator of transcription 1(STAT 1)を測定し、NF $\kappa$ B の転写活性を測定した。

3) BD 患者の血清抗体と補体についても

異常が指摘されていることから、血清抗体と補体のマンノース結合レクチン経路の検討を行った。

4) 生体内の炎症性徴候について  
生体かストレスを受けたときに、heme oxygenase(HO) 1 はヘムを CO とヒリヘルソン、Fe<sup>2+</sup>に分解し、それぞれの成分は抗酸化作用を示し、また抗炎症作用を示す。このため、HO-1 発現の誘導は生体内の自然体を利用した抗炎症による制御作用になることから HO-1 mRNA の発現を調べた。

## II 新しい治療法へのアプローチ

- 1 BD 患者の生体内における抗炎症因子の発現と治療への応用の可能性の検討
- 2 ノクロスポリンの感受性に関する遺伝子発現の検討
- 3 ステロイド治療の工夫
- 4 実験自己免疫性ぶどう膜炎と治療

## III 疫学調査と BD 患者の QOL に関する調査法の検討

疫学調査と患者の予後は 2003 年 1 月より全国の内科、眼科、皮膚科を有する 20 床以上の医療機関を対象に調査し、口腔内アフタに対する QOL に関しては General Oral Health Assessment Index(GOHAI)をもとに新しい尺度の開発を行った。

## C 研究結果と考察

### I BD の病因・病態について

#### 1 疾患責任遺伝子

1) 全ての外国人を含む BD 患者の遺伝子 HLA-B\*5101 のホモサンプルでは HLA B51 遺伝子はプロモーター、エクソン 1~8、イントロンの全ての遺伝子領域で塩基配列が一致していることが明らかにさ

れた。このことから、BD の伝播に関しては中東諸国から東方に伝播された可能性が強い(猪子)。

2) 日本人の BD 患者のケノムワイトな MS 法を用いた検索では 1、6、17、19 番染色体のスクリーニングで 90%の陽性率を得た(水木)。

### 2 発症外因子について

1) 発症外因のひとつとされてきた BD 患者の口腔内 S sanguis は、最近の細菌分類学に従って分類すると S sanguinis として登録されている(磯貝)。

2) 新しい分類の S sanguinis(旧 S sanguis)由来の HSP-60 と相同性の高い領域と BD 患者の T 細胞のエピトープに対応する合成ペプチドを抗原として BD 患者の末梢血単球を刺激した結果は、LO1 によって IL 12 の産生が起こり、LO 2 による TNF- $\alpha$ 、UK による IL-8 は健常者コントロールに比へて産生が低下していた(小林)。

3) BD 患者の IgA 抗体に対する S sanguinis は抗体価が高値であり また BD 患者の PBMC には IL 12 と IFN  $\gamma$  の強い産生をみた。一方、BD 患者の中には Helicobacter pylori 由来の HSP 60 にも高い IgG 抗体を有するものがあった(小能)。

### 3 BD 病変出現に関与する免疫現象

1) BD 病変の出現に関しては Th 1 型の反応が優位であることは、多くの研究者に指摘されている。鈴木、桑名は BD 患者の PBMC、病変部結節性紅斑および腸管型 BD の生検組織から HSP 60、Th 1 細胞の転写因子 Txk 蛋白の発現について検討した。PBMC および病変部には HSP 60 の過剰な発現と IL-12、IFN- $\gamma$ 、TNF  $\alpha$  の出現およ

ひ CCR5、CXCR3 の発現の亢進を認めた。一方、PBMC 中では活動期には CD3<sup>+</sup>T 細胞のうち CD8<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup>T 細胞が多く、また本来粘膜組織に存在する CD69<sup>+</sup>γ δ T 細胞が増加していることが明らかになった。しかし、CD4<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup>T 細胞の比率には活動期と非活動期とにおいて変化がみられなかった。この CD69<sup>+</sup>γ δ T 細胞ではその受容体は γ δ 1/γ δ 2 の比が増加していた。

2) DC は抗原情報伝達細胞 (antigen present cell, APC) として重要な役割を演じている。この APC を通して自然免疫の獲得が行われる。既に、BD 患者では *S sanguinis* の抗原性を獲得し、異常な過敏反応を呈することは明らかにされている。しかしながら、この抗原性獲得に関する詳細な機序は不明である。微生物ゲノム中に存在する CpG DNA は直接哺乳類の B 細胞、DC、単球を活性化して Th 1 型炎症性サイトカインを産生させるアヌハント作用が明らかになっている。このことから BD 患者の PBMC に CpG DNA を加えて培養したところ、健常人コントロールに比べて優位に強い IL-8 の産生が見られた。すなわち、DC を含む BD 患者の PBMC は APC としての Toll like receptor (TLR) 9 を介して細胞の活性化が行われたことを示唆している (佐藤)。

3) BD 患者は免疫遺伝学的に HLA-B51 を 60% 以上有するか、この遺伝子と免疫系細胞の反応性との関連については不明の域を出ない。特に、活動期患者では Th 1 型サイトカイン産生が増加し優勢であるので、免疫細胞系の IL-12、IFN γ 産生に重要な領域である interferon regulatory factor (IRF) 1 と IL 12 p 40 の発現について、HLA-B51 との関連を検討した。その結果、

DC 中の IL-12 p 40 の allele は BD 患者では allele A 80、allele C94 で健常人では allele A66、allele C64 であったか、BD 患者に高い傾向はあるか、有意な差はなかった。

一方、BD 患者の浸潤細胞は単核球のみならず好中球の浸潤も認められる。この多数の好中球の浸潤機序に関しては、従来より IL 8 をはしめとするケモカイン (CCR5、CXCR3 発現) の分泌が指摘されている。すなわち、浸潤の T 細胞、NK 細胞は細胞傷害性が活性化されていると推定される。岩月らは、その浸潤細胞の傷害活性化の指標として Granulysin の発現が口腔内アフタ性病変および毛嚢炎部にみられたことを示した。これらの浸潤細胞活性によって Th 1 細胞系からは TNF-α、IFN γ が産生されるか、これにより影響を受けた周辺の細胞では STAT 1 が発現されているはずである。また、Th 1 系炎症細胞の局所への遊走には IP-10/CXCL10 の発現も重要である。細胞モデルとして培養表皮細胞を用いて観察したところ、やはり STAT 1 が表現され、NF κ B 転写活性がみられ、IP 10/CXCL10 が発現されていた (中村)。

4) 血清免疫系反応については、これまで BD 患者では IgA、IgD が高値であり、補体系については補体価が異常に高いことが知られている。クローン病 (CD) と潰瘍性大腸炎 (UC) では anti *Saccharomyces cerevisiae* Mannan 抗体 (ASCA) が高値で、その抗体価を測定することにより、診断にも応用されていることから、BD においても検討を行ってみた。結果は、ASCA-IgA および ASCA-IgG のいずれも健常人より高値であったか、CD よりは低く、その中間値を呈していた。一方 補体マンノース

結合レクチン経路の活性は健常人との差はなかった(磯貝)。

5) 生体内に存在する内因子と炎症の関連をみるため、Heme Oxygenase(HO) 1について検討した。HO-1は、ヘムをCOとヒリヘルニン、Fe<sup>2+</sup>に分解する酵素については前述した。石ヶ坪はBD患者の末梢血多核白血球にHO 1mRNAとHO-1が発現していることを示し、BDでは多くの病変部に多数の多核白血球が浸潤する特徴に、何らかの役割を演じている可能性を示唆した。大野は生体の眼前房内にalpha melanocyte-stimulating hormone(αMSH)が存在し、これは免疫抑制作用を示すことが知られている。実験的にふとう膜炎を誘導したマウスでは、シクロオキシゲナーゼ(COX 2)が発現するか、αMSHの投与によってCOX 2の発現低下が見られた。

#### 4 腸管ヘーチェノト病の診断ガイドライン

BDはしばしば腸管症状を招来するか、その治療指針はこれまで示されていない。一般に不全型BDに腸管型が起こること多いか、その治療はサラノピリン 15 ASA およびステロイド療法が効果的であった(石ヶ坪)。

## II 新しい治療開発へのアプローチ

### 1 BD患者のふとう膜炎の治療

BD患者のふとう膜炎の調査から、他の疾患では眼サルコイドーシス、原田病に続いて、続発性の緑内障に移行する例が多く、26.9%の患者にみられた。

このようにBD患者のふとう膜炎の招来は本症の重要な合併症であり、患者の予後とQOLに大きな影響を与える。

1)BD患者のステロイド療法は、副作用の点から賛否両論の意見があり、臨床効果について問題を投げかけていた。そのため、ふとう膜炎に対する眼発作抑制療法としてコルヒチン、シクロスポリンなどの免疫抑制剤の投与が行われてきた。しかしながら、コルヒチン、シクロスポリンで抑制できない難治性BDには長期に免疫抑制剤と低用量のステロイド薬併用療法(プレドニソン7.5~40mg/day)を行うと眼発作回数を優位に減少させた(川島)。また、ステロイドのふとう膜炎局所に点眼、結膜下注射、後部テノン下注射なども従来行われてきたが、フルオノロノアセトニド眼内埋植(インフラント)が最近注目されている。すなわち、トリアムノロン4mgを硝子体内に注入し、徐々にステロイドの眼内に直接埋植し、除炎成功かを期待したものである。特に網膜、脈絡膜への有効性が高く、安全に使用できる。

2)シクロスポリンは強力な免疫抑制作用による治療効果を期待できるか、その効果には個人差がみられる。すなわち、鼻剤感受性に関与する遺伝子多型性が存在すると考えられる。薬物代謝酵素チトクロムp450(CYP)のサブファミリーでシクロスポリンの代謝に関与するCYP3A4、CYP3A5の遺伝子多型についてSNP法で検討した。結果はシクロスポリン感受性患者と非感受性患者と明らかな相関はみられなかった(太田)。

### 2 実験的ふとう膜炎の誘導と治療

大野はマウスに誘導した実験的自己免疫性ふとう膜炎(EAU)後に出現した制御性T細胞を脾臓より抽出し、誘導に用いた抗原として視細胞間レチノイト結合蛋白ヘプチト(IRBPp)でT細胞を活性化した後、EAU誘導マウスに養子移入した。それによって

EAU は養子移入しない群に比べて軽症であった。すなわち、EAU 誘導マウスには脾細胞中に CD4<sup>+</sup>T 抑制細胞が出現していた。この結果を確認すべく、制御性 CD4<sup>+</sup>T 細胞誘導は前房関連疫偏位(ACAID)機構によるものか、アルファメラノサイト刺激ホルモン( $\alpha$  MSH)が関与しているためか、またメラノマルチン 5 受容体欠損(MC5rKO)にも出現するかについて検討した。

これらの実験から EAU 後にはいずれも実験マウスには制御性 CD4<sup>+</sup>T 細胞が出現することか示された。さらに、治療の試みとして小野江らは Th 1 細胞系の反応に対して NF- $\kappa$ B 阻害剤(pyrrolidine dithiocarbamate)を EAU マウス、アロクラフトによって出現するアロクラフト炎症因子(AIF) 1 トランスジェニックマウス(Tgm)および Th 1 病モデルとしての trinitrobenzene sulfonic acid(TNBs)腸炎系マウスに対しても用いてみた。結果は Th 1 系反応が抑制され Th 2

系反応へとシフトが起り、治療への利用の可能性が示された(小野江)。

### III BD の疫学調査と QOL

1 全国の多施設を対象に、BD の患者数の推計と二次調査によって得られた結果から予後と QOL の分析を行った。2002 年 1 年間に 16,400 人の受療した患者が存在するものと推定された(稲葉)。

2 BD 患者には口腔内アフタ性潰瘍は必発に近いが、この出現によって接触 発音など口腔関連機能障害が起きる。患者の日常生活に与える影響は無視できない。このようなことから、口腔内アフタ性潰瘍の出現に対する QOL の研究は大切である。しかし、実際のところまた行われていない。福原らはその QOL の尺度として General Oral Health Assessment Index(GOHAI)の日本語版を製作している(福原)。

### Ⅲ 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金(厚生労働科学特別研究事業)  
ヘーチェット病に関する調査研究  
分担研究報告書

ヘーチェット病はどのようなルートで日本にもたらされたか

分担研究者 猪子 英俊<sup>1)</sup>、大野重昭<sup>2)</sup>

1) 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学2

2) 北海道大学大学院医学研究科視覚器病学分野

**研究要旨** ヘーチェット病はシロクロト沿いに患者が多く分布すること知られている。そこで、我々は日本人ヘーチェット病患者と外国人ヘーチェット病患者の遺伝的背景を比較検討し、ヘーチェット病かどのようなルートで日本にもたらされたかを明らかにするため、日本、イラン、トルコのヘーチェット病患者から採取した血液からDNAを抽出し、HLAタイピングを行い、頻度の多かったハプロタイプのサンプルを選んだ。その後、これらのサンプルをlong PCRにより増幅し、エクソン及びイントロンも含めたHLA-B遺伝子とその周囲の塩基配列を比較検討した。その結果、イントロンには多型が見られなかったが、HLA-B遺伝子のExon8の3'側に多型が認められた。また、マイクロサテライトを行ったところ、HLA-B遺伝子に有意な連鎖不平衡が見られた。このため、サブクローニングを行ない、exon8の3'側の多型を人種ごとに比較検討した。今後は、サンプル数を増やして、さらに比較検討をすすめる予定である。

#### A 研究目的

ヘーチェット病の原因遺伝子がHLA-B\*51自身であることは、これまでの我々の研究で強く示唆されているため、日本人及び外国人のヘーチェット病患者の遺伝的背景をHLA領域で比較検討する。また、比較検討の結果から、ヘーチェット病かどのようなルートで日本にもたらされたかを明らかにする。

#### B 研究方法

- 1 日本、イラン、トルコ、ヨルダンのヘーチェット病患者から採取した血液からDNAを抽出した。
- 2 HLA-A、BおよびC遺伝子のハプロタイプをSequence Based Typing(SBT)法を用いて決定し、HLA-B\*510101のホモのサンプルを選んだ。
- 3 HLA-B遺伝子をエクソンのみならず、イントロンも含めてdirect sequence法を用いて解析した。
- 4 マイクロサテライトの多型解析を行い遺伝子型の違いや、ハプロタイプの分布を比較検討した。
- 5 HLA-B\*510101のヘテロのサンプルをサブクローニングし、その後ホモのサンプルと同様にdirect sequence法を用い

て解析した。

(倫理面への配慮)

試料提供者には全て遺伝子研究に対する同意を得た上で、採血を行った。

#### C 研究結果

HLA-B\*510101のホモのサンプルでHLA-B51遺伝子はプロモーター、エクソン1-8、イントロンの全て遺伝子領域で塩基配列が完全に一致した。しかし、HLA-B51遺伝子のこく近傍の下流領域に7ヶ所の塩基多型が見つかった。これらのサンプルを用いてHLA遺伝子領域のマイクロサテライト多型を調べたところ、C1-2-5\_212とHLA-C\*0102に $\chi^2 = 12.7$ 、 $P = 2.88 \times 10^{-3}$ 、C1-2-5\_202とHLA-C\*140201の間に $\chi^2 = 26.6$ 、 $P = 2.04 \times 10^{-6}$ 、C1-2-5\_188とHLA-C\*1602に $\chi^2 = 20.7$ 、 $P = 4.29 \times 10^{-5}$ の優位な相関が見られた。しかし、ホモのサンプル数が少ないことから民族間での違いは見られなかった。このため、ヘテロのサンプルをサブクローニングし、direct sequence法を用いて解析を行った。その結果、ホモ



のサンプルと同様にHLA-B\*510101遺伝子は完全に一致し、その下流に7ヶ所の一塩基多型が見つかった。これらの一塩基多型を比較して系統樹を作成した(図1)。

#### D 考察

HLA-B\*510101の起原は一つであると考えられた。また、系統樹の結果より、西から東に伝播していったのではないかと考えられた。

#### F 将来の展望

さらにサンプル数を増やすことにより、さらにヘーチェト病の伝播の様子が解明されると考えられた。

#### Γ 研究発表

##### 1 論文発表

論文発表は行なっていない。

##### 2 学会発表

第7回アノアオセアニア組織的合成学会において発表した。

#### 著書

##### 国外欧文

1)Kulski JK, Inoko H MHC Genes In the Encyclopedia of the Human Genome Nature Publishing Group Macmillan Publishers Ltd Brunel Rd, Houndmills, Basingstoke, Hampshire, RG21 6XS, England

2)Kulski JK, Shuna I Anzai I, Kohara S, H Inoko Comparative genomic analysis of the MHC the evolution of class I duplication blocks, diversity and complexity Immunology Reviews

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

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

5)Mizuki N, Inoko H Behcet's disease Immunogenetics Vasculitis Diagnosis, Course and Treatment of Vasculitis Syndromes

##### 邦文

1)松坂恭成、猪子英俊 DNA解析と機能的ゲノム学が生む技術 医療機器センター15周年

記念誌、財団法人医療機器センター、東京、2001,p32-5

2)岡本浩一、田宮本元 猪子英俊 ポストゲノム時代の遺伝統計学(鎌谷直之編、ゲノムワイト相関解析による乾癬感受性遺伝子の検索、羊土社、東京、2001 p47-68

3)猪子英俊、高田肇 HLAの多型性と免疫応答 高畑班、

#### 2 原著

##### 国外欧文

1)Ikewaki I, Tamai H, Yamada A, Aoki M, Yamamoto R, Sawada A, Inoko H  $\Lambda$  microfilament formation inhibitor, cytochalasin strongly enhances the low-affinity Fc receptor II (CD23) expression on the human monocyte-like cell line, U937 J Clin Immunol 20 424-433, 2001

2)Deguchi R, Takagi A Kawata H, Inoko H, Miwa I Association between CabA+ Helicobacter pylori infection and p53, BAX and IGFb-RII gene mutations in gastric cancer patients Int J Cancer 91 481-485, 2001

3)Sugimura K, Ota M, Matsuzawa J, Katsuyama Y, Ishizuka K Mochizuki T, Mizuki N, Seki S, Honma I, Inoko H, Asakura H A close relationship of triplet polymorphism in MHC class I chain-related gene A (MICA) to the disease susceptibility and behavior in ulcerative colitis Issue Antigens 57 9-14, 2001

4)Ota M, Katsuyama Y, Kimura A, Isuchiya K, Kondo M, Naruse I, Mizuki N, Sasazuki I, Inoko H A second susceptibility gene for developing rheumatoid arthritis in the human MHC is localized within a 70 kb interval telomeric of the INF genes in the HLA class III region Genomics 71 263-70, 2001

5)Mizuki N, Yabuki K, Ota M, Verity D, Katsuyama Y, Ando H, Onari K, Goto K, Imagawa Y, Mandat W, Fayyad I, Stanford M, Ohno S, Inoko H Microsatellite mapping of a susceptible locus within the III A region for Behcet's disease using Jordanian patients Hum Immunol 62 186-90, 2001

6)Shuna I, Ando A, Suto Y, Kasai S, Shigenari A, Takishima N Kikkawa I, Iwata K, Kuwano Y Kitamura Y, Matsuzawa Y, Sano K, Nogami M,

- Kawata H, Li S, Fukuzumi Y, Yamazaki M, Iashiro H, Iamiya G, Kohda A, Okumura K, Ikemura T, Soeda F, Mizuki N, Kimura M, Bahram S, Inoko H. Genomic anatomy of a premier Major Histocompatibility Complex paralogous region on chromosome 1q21-22. *Genome Res* 11: 789-802, 2001
- 7) Matsuzaka K, Makino S, Nakajima K, Tomizawa M, Oka A, Bahram S, Kulski JK, Iamiya G, Inoko H. New microsatellite markers in the human MHC class III region. *Tissue Antigens* 57: 397-404, 2001
- 8) Mizuki N, Ota M, Katsuyama Y, Yabuki K, Ando H, Yoshida M, Katsuhiko O, Nishim B, Davatchi I, Chams H, Ghaderi AA, Ohno S, Inoko H. HLA class I genotyping including HLA-B\*51 allele typing in the Iranian patients with Behcet's disease. *Tissue Antigens* 57: 457-62, 2001
- 9) Gasper JA, Shuna I, Inoko H, Edwards SA. Songbirds genomics. Analysis of 45 kb upstream of a polymorphic Mhc class II gene in red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*). *Genomics* 75: 26-34, 2001
- 10) Ando A, Kawata H, Murakami T, Shigenari A, Shuna T, Sada M, Tsuji I, Torii A, Nakanishi Y, Mitsuhashi I, Sekikawa K, Inoko H. cDNA cloning and genetic polymorphism of the swine major histocompatibility complex (SLA) class II DMA gene. *Anim Genet* 32: 73-7, 2001
- 11) Holland LZ, Rached LA, Lamme R, Holland ND, Inoko H, Shuna I, Burgdorf C, Iardelli M. Characterization and developmental expression of the amphioxus homolog of Notch (AmphiNotch): evolutionary conservation of multiple expression domains in amphioxus and vertebrates. *Dev Biol* 232: 493-507, 2001
- 11) Obuchi N, Takahashi M, Nouchi T, Satoh M, Arimura I, Ueda K, Akai I, Ota M, Naruse I, Inoko H, Numano I, Kimura A. Identification of MIC A alleles with a long Ceu-I repeat in the transmembrane region and no cytoplasmic tail due to a frameshift-deletion in exon 4. *Tissue Antigens* 57: 520-535, 2001
- 12) Arai I, Yoshida K, Kaburaki J, Inoko H, Ikeda Y, Kawakami Y, Kuwana M. Autoreactive CD4(+) T-cell clones to beta(2)-glycoprotein I in patients with antiphospholipid syndrome preferential recognition of the major phospholipid-binding site. *Blood* 98: 1889-96, 2001
- 13) Kulski JK, Martinez P, Longman-Jacobsen N, Wang W, Williamson J, Dawkins RI, Shuna I, Naruse I, Inoko H. The association between HLA-A alleles and an Alu dimorphism near HLA-C. *J Mol Evol* 53: 114-23, 2001
- 14) Tsuda IT, Tsuda M, Naruse T, Kaata H, Ando A, Shuna I, Fukuda M, Kurita M, KeMaho I, Kulski JK, Inoko H. Phylogenetic analysis of penguin (Spheniscidae) species based on sequence variation in MHC class II gene. *Immunogenetics* 53: 712-6, 2001
- 15) Taniguchi Y, Sato M, Tanaka O, Sekiguchi M, Inoko H, Kimura M. HOXD3 regulates expression of JAGGED1, a ligand for Notch receptors. *Nucl Acids Res Supplement No 1*: 43-4, 2001
- 16) Ianuchi Y, Suzuki H, Ohtsuka M, Kikuchi N, Kimura M, Inoko H. Isolation and characterization of three gemmes paralogs to mouse Ring3. *Nucl Acids Res Supple No 1*: 247-8, 2001
- 17) Seki SS, Sugimura K, Ota M, Matsuzawa J, Katsuyama Y, Ishizuka K, Mochizuki I, Suzuki K, Yomevama Y, Mizuki N, Honma I, Inoko H, Asakura H. A stratification analysis of MIC A triplet repeat polymorphisms and HLA-A-antigens associated with ulcerative colitis. *Tissue Antigens* 58: 71-6, 2001
- 18) Sano K, Yabuki Y, Imagawa Y, Shuna I, Mizuki N, Ohno S, Kulski JK, Inoko H. The absence of disease-specific polymorphisms within the HLA-B\*51 gene that is the susceptible locus for Behcet's disease. *Tissue Antigens* 58: 77-82, 2001
- 19) Romphruk AV, Naruse TK, Romphruk A, Kawata I, Pauapairoj, Kulski JK, Leelayuwat, Inoko H. Diversity of MIC A (PFRB11.1) and HLA A haplotypes in Northeastern Thai. *Tissue Antigens* 58: 83-9
- 20) Mizuki N, Ota M, Katsuyama Y, Yabuki K, Ando H, Shuna I, Nomura I, Onari K, Ohno S, Inoko H. HLA-B\*51 allele analysis by the PCR-SBT method and a strong association of HLA-B\*5101 with Japanese patients with

- Behcet's disease *Tissue Antigens* 58 181-4, 2001
- 21)Kulski JK, Dunn DS, Gaudieri S, Shina I, Inoko H Genomic and phylogenic analysis of the human C1D1 and HLA class I multicopy genes *J Mol Evol* 53 642-650, 2001
- 22)Ishikawa Y, Kashiwase K, Oka M, Ogawa A, Akaza T, Morishima Y, Inoko H, Sasazuki T, Kodera Y, Juji I Polymorphisms in the coding region of mtDNA and effects on clinical outcome of unrelated bone marrow transplantation *Bone Marrow Transplant* 28 603-7, 2001
- 23)Nuzeki H, Naruse I, Hecker KH, Taylor JR, Kurimoto I, Shimizu T, Yamasaki Y, Inoko H, Streilein JW Polymorphisms in the tumor necrosis factor (TNF) genes are associated with susceptibility to effects of ultraviolet-B radiation on induction of contact hypersensitivity *Tissue Antigens* 58 369-78, 2001
- 24)Suemizi H, Radosavljevic M, Kimura M, Sadahiro S, Yoshimura S, Bahrama S, Inoko H A basolateral sorting motif in the MIC-A cytoplasmic tail *Proc Natl Acad Sci USA* 99 2971-6, 2002
- 25)Kulski JK, Dunn DS, Hui J, Martinez P, Romphruk W, Leelayuwat C, Jay GK, Oka A, Inoko H Alu polymorphism within the MICB gene and association with HLA-B alleles *Immunogenet* 53 975-9, 2002
- 26)Horiki I, Ichikawa Y, Moriuchi J, Hoshina Y, Yamada C, Wakabayashi T, Jackson K, Inoko H HLA class II haplotypes associated with pulmonary interstitial lesions of polymyositis/dermatomyositis in Japanese patients *Tissue Antigens* 59 25-30, 2002
- 27)Abi-Rached T, Gilles A, Shina I, Pontarotti P, Inoko H Evidence of en bloc duplication in vertebrate genomes *Nat Genet* 31 100-5, 2002
- 28)Ishikawa Y, Kashiwase K, Akaza T, Morishima Y, Inoko H, Sasazuki T, Kodera Y, Juji I Polymorphisms in TNFA and TNFR2 affect outcome of unrelated bone marrow transplantation *Bone Marrow Transplant* 29 569-57, 2002
- 29)Mizuki N, Ota M, Katsuyama Y, Yabuki K, Ando H, Shina I, Palmeris GD, Kaklamani E, Ito D, Ohno S, Inoko H Sequencing-based typing of HLA-B\*51 alleles and the significant association of HLA-B\*5101 and -B\*5108 with Behcet's disease in Greek patients *Tissue Antigens* 59 118-121, 2002
- 30)Tanaka S, Kobayashi I, Nakanishi K, Okubo M, Odawara M, Murase T, Hashimoto M, Watanabe G, Matsushita H, Inoko H, Takeuchi K Corticosteroid-Responsive Diabetes Mellitus Associated with Autoimmune Pancreatitis Pathological Examinations of the Endocrine and Exocrine Pancreas *Ann NY Acad Sci* 958 152-9, 2002
- 31)Morishima Y, Sasazuki T, Inoko H, Juji T, Akaza T, Yamamoto K, Ishikawa Y, Kato S, Sao H, Sakamaki H, Kawa K, Hamajima N, Asano S, Kodera Y The clinical significance of human leukocyte antigen (HLA) allele compatibility in patients receiving a marrow transplant from serologically HLA-A, HLA-B, and HLA-DR matched unrelated donors *Blood* 11 4200-6, 2002
- 32)Moribe I, Hirai H, Kimura M, Inagawa A, Nakatani S, Kaneshige I, Inoko H Rapid and simultaneous HLA class I (-A, -B and -C loci) DNA typing using the microtitre plate-reverse hybridization assay (MKHA) *Euro J ournal of Immunogenet* 29 191-204, 2002
- 33)Dunn S, Naruse I, Inoko H, Kulski JK The association between HLA-A-A alleles and young Alu dimorphisms near HLA-J, -H and -F genes in Workshop cell lines and Japanese and Australian populations *J Mol Evol* 5 1-9, 2002
- 34)Jaini R, Naruse T, Kanga U, Kaur G, Inoko H, Mehar NK Molecular diversity of the HLA-A\*19 group of alleles in North Indians. Possible oriental influence *Tissue Antigens* 49 487-91, 2002
- 35)Matsuzaka Y, Tounai K, Denda A, Tomizawa M, Makino S, Okamoto K, Keicho N, Oka A, Kulski JK, Tamiya G, Inoko H Identification of novel candidate genes in the diffuse panbronchiolitis critical region of the class I human MHC *Immunogenet* 54 301-309, 2002
- 36)Jaini R, Naruse I, Kanga U, Kikkawa E,

Kaur G, Inoko H, Mehra NK Molecular diversity of the HLA-A\*19 group of alleles in North Indians Possible oriental influence *Issue Antigens* 59 487-91, 2002

37) Naruse IK, Kawata H, Inoko H, Isshiki K, Yamano K, Hino M, Iatsumi N The HLA-DOB gene displays limited polymorphism with only one amino acid substitution *Issue Antigens* 59 512-9, 2002

38) Matsuzaka Y, Okamoto K, Tsuji H, Mabuchi I, Ozawa A, Iamiya G, Inoko H Identification of the hRDH-F2 gene, a novel member of the SDR family, and its increased expression in psoriatic lesion *Biochem Biophys Res Commun* 297 1171-4, 2002

39) Matsuzaka Y, Makino S, Okamoto K, Oka A, Tsujimura A, Matsumiya K, Takahara S, Okuyama A, Sada M, Gotoh R, Nakatani I, Ota M, Katsuyama Y, Iamiya G, Inoko H Susceptibility locus for non-obstructive azoospermia is localized within the HLA-DR/DQ subregion Primary role of DQB1\*0604 *Issue Antigens* 60 53-63 2002

40) Hui J, Oka A, Iamiya G, Tomizawa M, Kulski JK, Penhale WJ, Tav GK, Iizuka M, Ozawa A, Inoko H Corneodesmosin DNA polymorphisms in MHC haplotypes and Japanese patients with psoriasis *Issue Antigens* 60 77-83, 2002

41) Nuzeki H, Inoko H, Wayne Strublein J Polymorphisms in the INI region confer susceptibility to UVB-induced impairment of contact hypersensitivity induction in mice and humans *Methods* 28 4-50, 2002

42) Tanaka S, Kobayashi I, Nakanishi K, Koyama R, Okubo M, Odawara M, Murase I, Hashimoto M, Watanabe G, Matsushita H, Inoko H, Takeuchi K Corticosteroid-responsive Diabetes mellitus associated with autoimmune pancreatitis Pathological examination of the endocrine and exocrine pancreas *Ann NY Acad Sci* 958 152-9, 2002

43) Ikewaki N, Inoko H A very late activating antigen- $\alpha$ 4 (CD49d) monoclonal antibody, BU49 induces phosphorylation of a cAMP response element-binding protein (CREB),

resulting in induction of homotypic cell aggregation and enhancement of interleukin-8 (IL-8) production *Microrbiol Immunol* 46 685-95, 2002

44) Tanaka S, Kobayashi I, Nakanishi K, Koyama R, Okubo M, Murase I, Odawara M, Inoko H Association of HLA-DQ genotype in autoantibody-negative and rapid-onset type 1 Diabetes *Diabetes Care* 25 2302-7, 2002

45) Kulski JK, Shiina I, Anzai I, Kohara S, Inoko H Comparative genomic analysis of the MHC The evolution of class I duplication blocks, diversity and complexity from shark to man *Immunology Reviews* 190 95-122, 2002

46) Mizuki N, Yabuki K, Ota M, Katsuyama Y, Ando H, Nomura E, Funakoshi K, Davatchi I, Chams H, Nikbin B, Chaerri AA, Ohno S, Inoko H Analysis of microsatellite polymorphism around the HLA-B locus in Iranian patients with Behcet's disease *Issue Antigens* 60 396-9, 2002

#### 国内欧文

1) Matsuzaka Y, Kagotani K, Okumura K, Kimura M, Inoko H, Taniguchi Y Isolation and structural analysis of the mouse NAI (RING3) gene in the MHC class II region *Kakusan Kagaku*

2) Akisaka M, Suzuki M, Inoko H Genetic Influence of HLA-DR on longevity in Okinawan people *Ryukyuu Igaku Zasshi* in press

#### 3 総説

##### 国外欧文

Mizuki N, Inoko H, Ohno S Molecular genetics (HLA) of Behcet's disease Yabuki K, Inoko H, Ohno S *Immunogenetics and uveitis, Ophthalmology* in press

##### 邦文

1) 田宮元、猪子英俊 ケノム医科の最新展開 遺伝的相関解析を中心として、細胞T子、20 61-4, 2001

2) 田宮元、猪子英俊 HLA 領域のケノム配列とその意義、最新医学、56 26-32, 2001

3) 岡本浩一、田宮元、猪子英俊 慢性関節リウマチ感受性遺伝子、リウマチ 40 917-26