

2001

- 4) 堀木昭美、猪子英俊 膠原病と HLA 血液フロンティア 11 67-76、2001
- 5) 中島舞子、成瀬妙子、猪子英俊 HLA クラス II 抗原提示における HLA-DO の役割、臨床免疫 35 661-6、2001
- 6) 田呂元、藤本慶、猪子英俊 クノムワイトなヒト疾患解析とハイオインフォマティクス、実験医学 19 147-52、2001
- 7) 津田とみ、猪子英俊 異種の MHC ペンキネ MHC、8 56-81 2001
- 8) 猪子英俊、松坂朴成 ポストゲノム時代の疾患関連遺伝子解析、KAST Report, 13 1-7、2001
- 9) 椎名隆、猪子英俊 ノークエンノクによる MHC 領域の比較ゲノム解析、蛋白質 核酸 酵素、46 2246-53、2001
- 10) 藤本慶、田呂元、猪子英俊 並列処理コンピュータシステムによるゲノム解析研究、細胞工学、20 1653-9、2001
- 11) 猪子英俊 HLA は何故多くの疾患発症に関わるのか? 日本皮膚科学会雑誌、111 1704-7、2001
- 12) 岡本浩一 猪子英俊 マイクロサテライトマーカー、医学のあゆみ、200 1254-5、2002
- 13) 岡本浩一 田呂元、猪子英俊 マイクロサテライトの性質と遺伝的マーカーとしての有用性 -ゲノムワイト相関解析による疾患感受性遺伝子の同定を目指して-、ゲノム医学、2 1254-5 2002
- 14) 杉田法久 猪子英俊 膠原病の遺伝的病因究明は進んだか、総合臨床、51 2112-5 2002
- 15) 岡本浩一、猪子英俊 マイクロサテライトマーカーを用いたゲノムワイトな遺伝的相関解析、医学のあゆみ、202 769-73、2002
- 16) 岡本浩一 岡晃、猪子英俊 マイクロサテライト閉鎖マーカーを用いた疾患解析の現状と展望 - モデル領域としての HLA からゲノムワイトなレベルへ、Molecular Medicine (臨時増刊号 癌ゲノム学) 39 34-41、2002
- 17) 池脇信直、猪子英俊 Aureobasidium pullulans FFRM-P4257 由来する新規微生物多糖の生体免疫反応に与える影響、臨床免疫 38 313-9、2002
- 18) 女西達也 椎名隆、猪子英俊 チンパノンのゲノム ヒトゲノム 生物の科学 遺伝 15 137-46、2002

- 19) 岡本浩一、猪子英俊 マイクロサテライトを用いた閉鎖リウマチ感受性遺伝子の同定、臨床免疫 38 593-9 2002
- 20) Aureobasidium pullulans FFRM-P4257 由来の新規微生物多糖の生体免疫反応に与える影響 臨床免疫 38 313-9、2002

4 字会などにおけるノノポンウム、特別講演、教育講演など  
国外での国際学会

- 1) Inoko H Genomewide scan of disease genes through microsatellites, Special Lecture, The 1st Indian Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 2001
- 2) Naruse TK, Kawata H, Nakashima M, Inoko H Simple and rapid HLA-A and DRB1 SSP genotyping using the 2 color dyes fluorescence detection system The 1st Indian Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 2001
- 3) Inoko H Strategy for genome wide disease mapping using microsatellites EXTRA SEMINAR in Department of Immunohematology and Blood Transfusion Leiden University, 2001
- 4) Inoko H Strategy for genome wide disease mapping using microsatellites by association study Seminar in Max-Planck-Institute from Molecular Genetic, 2001
- 5) Inoko H Genomewide scan of disease genes through microsatellites, Special Lecture, The 1st Indian Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 2001
- 6) Naruse TK, Kawata H, Nakashima M, Inoko H Simple and rapid HLA-A and DRB1 SSP genotyping using the 2 color dyes fluorescence detection system The 1st Indian Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 2001
- 7) Inoko H Strategy for genome wide disease mapping using microsatellites EXTRA SEMINAR in Department of Immunohematology and Blood Transfusion Leiden University, 2001
- 8) Inoko H Strategy for genome wide disease mapping using microsatellites by association study Seminar in Max-Planck-Institute from Molecular Genetic, 2001
- 9) Inoko H Comparative MHC Genomics, 5th Chromosome Workshop, 2001

- 10) Inoko H Genome-wide scan of disease genes through microsatellites The Korean Society for Immunology, 2001
- 11) Inoko H HLA to human genome diversities Genomewide scan of disease genes by association analysis using microsatellites, Plenary session in the 16th European Histocompatibility Conference EFL Meeting, 2002
- 12) Tateno Y, Fukami-Kobayashi K, Shina I, Anzai I, Yamazaki M, Inoko H Molecular Evolution of a MHC Genome Region in Apes The 1st International Genomic Symposium, 2002
- 13) Inoko H PSORS1 and genome-wide mapping by microsatellite-based association analysis The 6th International Psoriasis Genetics Committee Meeting, 2002
- 14) Inoko H From HLA to human genome diversities Disease gene mapping by association analysis using microsatellites, Keynote addresses in the 13th International Congress of Histocompatibility and Immunogenetics, 2002
- 15) Inoko H Genomewide scan of disease genes using microsatellites, 13th Hake Shirakabako Conference International Symposium on Epigenetics in Reproduction 2002
- 16) Inoko H Genomewide scan of disease genes using microsatellites, Scientific Counsel Conference in Ministry of Health, National Institute of Health of Mongolia Medical University 2002
- 17) Inoko H Comparative genetics of MHC in several species, 7th International Workshop on MHC Evolution, 2002
- 18) Inoko H From HLA to human genome diversities genome wide scan of disease genes by association analysis using microsatellites, 2002 Annual meeting of the French Society of Immunology, Europe-Japan Symposium in Immunology, 2002
- 19) Shina I, Inoko H Comparative genetics of MHC in several species, 7th International Workshop on MHC Evolution, 2002

日本が主催する国際学会

- 1) 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
- 2) Inoko H, Anzai T, Fukuzumi Y, Yamazaki M, Iashiro H, Kulski JK, Shina T Genome sequencing and comparative genome analysis on the chimpanzee MHC class I region GEMINI Workshop on Ape Genomics, 2001
- 3) Inoko H Comparative genomics on the MHCs by genome sequencing Symposium on Evolution Genomics, 2001
- 4) Inoko H Genome-wide scan of disease genes by association analysis using microsatellites The 1st Hakone-yama Symposium, "Genetic analysis of Multifactorial Diseases" 2001
- 5) Inoko H Genome-wide scanning of disease-susceptible loci by microsatellite markers Genomics and Phenomics of Vasculitis and Atherosclerosis, 2001
- 6) Inoko H HLA and hepatitis C virus positive cardiomyopathy International congress on cardiomyopathies and heart failure, 2002
- 7) Inoko H Strategy for genome-wide scan of disease genes by association analysis using microsatellites-HLA region as a model system, Aids Vaccine Symposium, 2002
- 8) Inoko H Genome-wide scan of disease genes by association analysis using microsatellites, 家畜ゲノム国際ワークショップ 2002
- 9) Inoko H Comparison of MHC genomic sequences among primates (humans, chimpanzees and macaques), Symposium on "Molecular Basis of Evolution" 2002
- 10) Takemoto Y, Ohno S, Inoko H Comparison of HLA-B51 haplotypes and microsatellite polymorphisms in Behcet's disease of multiple populations, 第7回アノアオセアニア組織的合成学会, 2003

日本での学会研究会など

- 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 ケノムノポノウム, 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 ケノムワイト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ケノムワイト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 GI (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ストラテジー -HLA 領域をモデルとして-、第8回日本遺伝子診療学会大会 ノンポノウム「ケノムの個性と疾患」、2001
- 6)猪子英俊 疾患関連遺伝子同定のストラテジー -HLA 領域をモデルとして-、山之内製菓セミナー
- 7)猪子英俊 疾患関連遺伝子同定のストラテジー -HLA 領域をモデルとして-、湧永製菓セミナー
- 8)猪子英俊 HLAと相関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 遺伝子領域のケノム構造、第10回日本組織適合性学会 ノンポノウム「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 と相関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 ノンポノウム「多因子疾患の遺伝的要因としての HLA」2001
- 11)猪子英俊 ホストケノムノックアウト解析のモデル領域としてのMHC -ケノム多様性解析と比較ケノム解析-、第10回日本組織適合性学会 ノンポノウム「MHC-総合ケノム科子の視点から」2001
- 12)猪子英俊 箱根山ノンポノウム”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ケノムワイトなマッピングの戦略 第9回難病治療研究会、2001
- 14)猪子英俊 マイクロサテライトを用いたケノムワイトな相関解析による疾患遺伝子マッピング、第40回長崎大学大学院特別セミナー、2001
- 15)猪子英俊 ポストケノム時代における未知疾患原因遺伝子の追索-マイクロサテライトを用いた相関解析-、第3回ライフサイエンス研究会、2002
- 16)猪子英俊 HLA 遺伝子領域の進化と構築、第19回近畿HLA研究会 特別講演、2002
- 17)猪子英俊 マイクロサテライトを用いたケノムワイトな疾患遺伝子マッピングの戦略-HLAをモデル領域として- 沖縄腎フォーラム特別研究会 2002
- 18)猪子英俊 マイクロサテライトを用いたケノムワイトな疾患遺伝子マッピングの戦略、九州大学生体防御医学研究所セミナー、2002
- 19)猪子英俊 マイクロサテライトを用いたケノムワイトな疾患遺伝子マッピングの戦略、基礎生物医学研究所大学院セミナー、2002
- 20)猪子英俊 HLA と疾患との相関、特に感染症について、第 71 回日本寄生虫学会大会特別講演、2002
- 21)猪子英俊 RA 関連遺伝子 - HLA、第 46 回日本リウマチ学会ノンポノウム 2002
- 22)猪子英俊 HLA からケノムワイトへ -マイクロサテライトを用いたケノムワイトな疾患関連遺伝子マッピングの戦略- 北陸血液 免疫懇話会 2002
- 23)猪子英俊 HLA 研究-現状と将来、ヘリタス講演会(大阪)2002
- 24)猪子英俊 HLA 研究-現状と将来、ヘリタス講演会(福岡)、2002
- 25)猪子英俊 多因子性遺伝病のマッピングの話を中心に、第4回、日本進化学会ノンポノウム「ケノムが進化する ケノム生物学 ケノム医科からの展望」(東京)、2002
- 26)猪子英俊 HLA 遺伝子領域の構造、平成14年度認定 HLA 検査技術講習会、2002

27)猪子英俊 ホストゲノムノックアウトとしてのゲノム多様性解析と比較ゲノム解析—ヒトHLA領域をモデルとして—、第6回ESセミナー、滋賀医大、2002

28)猪子英俊 MIC をはし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

29)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

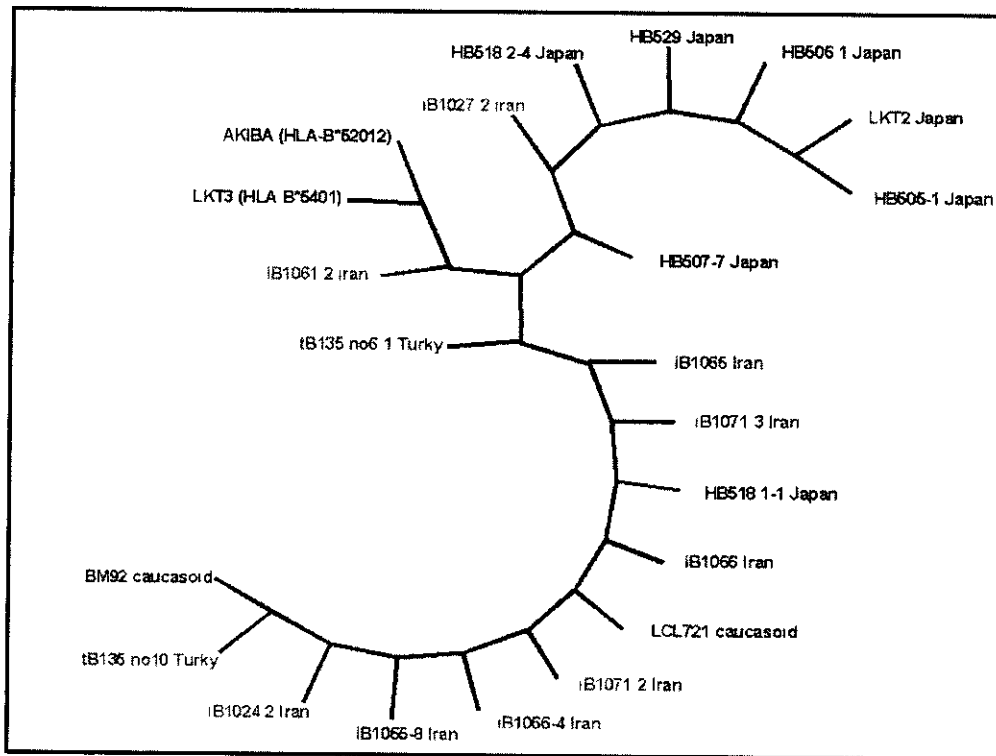
30)猪子英俊 HLAと疾患感受性 HLA領域から全ゲノムの疾患遺伝子同定の戦略に向けて、移植感染症学講演会、2002

31)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

32)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

33)椎名隆、猪子英俊 ノックアウトによる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—真の解読完了のために何か必要か—」、2002

34)猪子英俊 マイクロサテライト多型を用いたケ疾患遺伝子探索、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



分担研究報告書

ケノムワイトなマイクロサテライトマノピノクによるヘーチェノト病の  
原因遺伝子の検索に関する研究

分担研究者 水木 信久 横浜市立大学 医学部 眼科 教授  
協力研究者 伊藤 良樹<sup>1)</sup>, 山根 敬浩<sup>1)</sup>, 庵山 直昭<sup>1)</sup>, 佐々木 爽<sup>1)</sup>, 伊藤 典彦<sup>1)</sup>,  
西田 朋美<sup>1)</sup>, 竹本 裕子<sup>2)</sup>, 南場 研一<sup>3)</sup>, 大野 重昭<sup>2)</sup>, 岡 晃<sup>3)</sup>, 田宮 元<sup>1)</sup>,  
猪子 英俊<sup>1)</sup>

- 1) 横浜市立大学 医学部 眼科
- 2) 北海道大学 医学研究科 視覚器病学
- 3) 東海大学 医学部 分子生命科学 遺伝情報部門

研究要旨

ヘーチェノト病は人種を越えてHLA-B51抗原と相関することか知られている。ヘーチェノ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、全ケノムをカハ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ている。現在1、6、17、19番染色体の1次スクリーニングが終了し、それらの陽性率は9.0%であった。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。

A 研究目的

ヘーチェノ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か知られており、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、ヘーチェノト病患者では、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。したかつて、本病発症にはHLA-B51抗原対立遺伝子以外の他の遺伝子も関与している可能性か考えられ、これら複数の遺伝的素因か備わった場合に、何らかの外的環境要因か働いて初めて発症すると考えられる。現在我々は、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し、全ケ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ケノムワイトな疾患遺伝子マノピノクを行っている。

B 研究方法

疾患遺伝子検索法として全染色体、全ケノムを対象としたケノムワイトなマイクロサテライトマノピノク法を用いる。マイクロサテライト (MS) とはヒトケノム状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、すなわち個人差かあることか知られている。つまり患者群と対照群でアリル分布を比較することにより 疾

患遺伝子マノピノク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かはるかに豊富で、連鎖不平衡を示す距離もSNP (single nucleotide polymorphism) に比べはるかに長いため、より効率的に疾患遺伝子マノピノクか可能である。ヒト全ケノム塩基配列は3.1GB (31億塩基対) であるか、すでに我々は100kb (MSの連鎖不平衡の距離) 毎に全ケノムをカハする多型性豊富なMSを約3万個 (3.1GB÷100kb=3.1万個) 収集した。したかつて、まずMSマノピノクにより効率的にヘーチェノ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330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330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、性別をマノチノクさせた健常群100サンプルを用いる。DNAはQiagen DNA Blood Maxi Kitを用いて抽出し、Pico Green 定量キット (Pico Green 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ターMTP-100Fによる定量および、テータ処理ソフト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 (CV) か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をおこない、ケノムホワイトに設定した約3万個のマイクロサテライトマーカーのアリル頻度を解析する。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、推定アリル頻度を求める。これは波形パターンからすへ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)

すへ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。

### C 研究結果および考察

ケノムホワイトな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共に500人前後が必要である。このためヘ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330人のヘーチェット病患者(表1)の血液検体すへてから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 36.3歳、完全型

34人、不全型 60人、特殊型 6人であった(表2)。このサンプルを用いてpooled DNAを作成し、16 17 19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(表3)。4つの染色体に設定したMSマーカーのうち9.0%が統計学的に有意なマーカーとなり、それらは2次スクリーニング用マーカーとしてリストアップした。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。

### D 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ヘ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。

### E 健康危険情報 特になし

### F 研究発表

- 1 論文発表 なし
- 2 学会発表

第107回日本眼科学会総会(日本眼科学会雑誌第107巻 p149 2003)

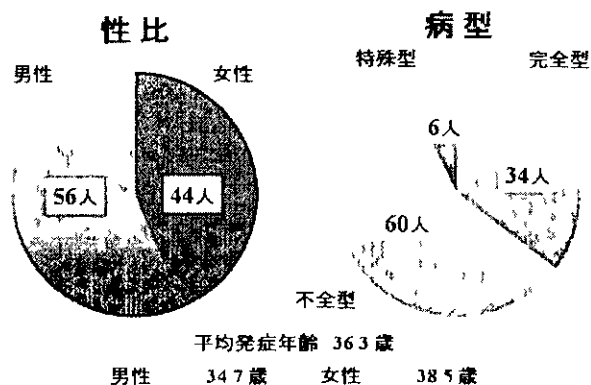
### G 知的財産権の出願 登録状況(予定を含む) なし

## 検体の収集状況

横浜市立大学	97
北海道大学	56
久留米大学	1
ゆあさ眼科	39
ベージェット病友の会 静岡県支部	12
ベージェット病友の会 神奈川県支部	21
ベージェット病友の会 全国総会	27
ベージェット病友の会 福島県支部	6
ベージェット病友の会 石川県支部	30
ベージェット病友の会 大阪府支部	26
ベージェット病友の会 山形県支部	6
ベージェット病友の会 兵庫県支部	6
ベージェット病友の会 埼玉支部	3

総検体数・330

## 一次スクリーニング用Pooled DNA



## ベーチェット病 1次スクリーニング

染色体	マーカー数	Fisher正確検定		
		2×2 (P<0.05)	2×m (P<0.05)	2×2 or 2×m (P<0.05)
Chr 01	1517	6.2%	1.6%	6.3%
Chr 06	1265	11.9%	5.2%	12.1%
Chr 17	501	9.4%	4.2%	9.7%
Chr 19	370	10.8%	6.3%	10.8%
Total	3653	8.9%	3.5%	9.0%

厚生労働科学研究補助金（難治性疾患克服研究事業）  
ヘーチェント病に関する調査研究  
分担研究報告書

ヘーチェント病患者より分離されたレンサ球菌の同定

分担研究者 磯貝恵美子 北海道医療大学歯学部口腔衛生  
研究協力者 河村好章 岐阜大・院 医・微生物ハイオインフォマティクス  
三島徳子 岐阜大・院 医 微生物ハイオインフォマティクス  
伊藤葉子 岐阜大・院・医 微生物ハイオインフォマティクス  
大楠清文、岐阜大・院・医 微生物ハイオインフォマティクス  
江崎孝行 岐阜大・院・医・微生物ハイオインフォマティクス

### 研究要旨

ヘーチェント病(BD)の原因は未だ特定されておらずレンサ球菌か長く疑われてきたか、その正確な菌種名は決定されていなかった。そこで、以前より汎用されているBD患者由来3菌株(113-20, 114-23, 118-1)の分類学的検討を行った。各菌株の16S rRNA塩基配列を決定し、その系統位置を確認したところ、3株共にレンサ球菌属のmitis groupに属することか示された。進化速度の速いSOD(superoxide dismutase)遺伝子の部分塩基配列を用いた系統解析から菌株113-20と114-23は*S. oralis*、118-1は*S. sanguinis*であることが示唆された。市販の同定キット(ストレプトグラム)でも同様の同定結果が得られた。最終的にDNA相同試験を行なったところ、菌株113-20と114-23は*S. oralis*、118-1は*S. sanguinis*であるとの結論に至った。

#### A 研究目的

ヘーチェント病(BD)は再発性の口腔および外圍陰部の潰瘍、ふとう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きた。現在、内因と外因の2つの側面から原因究明への研究が続けられている。BD患者では口腔細菌叢は健康成人とは異なり、特殊な口腔 *Streptococcus* が有意に増加しており、好中球の活動性と相関することを報告した。これらの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た。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。当時の同定結果からこれらの分離株は *Streptococcus sanguis* とされてきた。その後 *Streptococcus* 属の分類の見直しか

すすめられており BD分離株についても分類学的にどこに位置するかを再検討することか必要となった。そこで、本研究では以前より汎用されているBD患者由来菌株の分類学的検討を行った。

#### B 研究方法

再分類を行った菌株はヘーチェント病患者由来株として古くから使われている3菌株である(表1)。菌株番号113-20、114-23、118-1のうち2株については *Streptococcus sanguinis* としてATCCに既に登録されている。比較検討のため、レンサ球菌9菌種の分類学上の基準株も使用した。なお、以降のテータでは、岐阜タイプカルチャーの略称であるGTC番号に統一して記載した。

方法としては(1)16S rRNA塩基配列の比較から求めた遺伝距離を基に各菌種の系統位置を算出(2)*sod*遺伝子を使った系統解析、(3)ストレプトグラム(同定キット)による生化学性状の解析、(4)



DNA DNA hybridization 試験を行った。

### C 研究結果

図1に16S rRNA塩基配列の比較から求めた遺伝距離を基に各菌種の系統位置を算出して描いた系統樹を示した。現在レンサ球菌には50以上の菌種および亜種が知られているか、このように系統樹を描くと大きく6つのグループ、すなわち *mitis* group, *salivarius* group, *bovis* group, *mutans* group, *anginosus* group, *pyogenic* group—に分れることか既に明らかとなっている。従ってBD由来株についても、その塩基配列を決定することにより、レンサ球菌の中のとどのグループに属するかを決定することかできる。

16S rRNA塩基配列に基づく遺伝子系統樹の解析結果を図2に示した。BD患者分離株は3株共に *mitis* group に属することかわかった。さらに、GTC1182とGTC1183は *S. oralis*, *S. mitis*, *S. pneumoniae* や *S. infantis* と近隣に位置し、GTC1184は *S. sanguinis* に最も近い位置を占めていた。

16S rRNAによる系統解析では属あるいは特定の菌種グループまでは信頼性高く特定することかできるか、類縁の菌種を明確に鑑別するには不向きである。さらに *Streptococcus* 属の *mitis* group に属する菌種はお互いに遺伝的に非常に類縁で相互の鑑別が非常に難しい事か知られている。そこで遺伝子進化速度の速い *sod* 遺伝子を使った系統解析を試みた。

図3は *sod* 遺伝子の塩基配列に基づく系統樹である。図には基準株のみならず日本およびイギリスで分離された菌株合計90株について系統位置を示してある。各菌種はそれぞれクラスターを形成している。ここでBD患者由来3株のうちGTC1182およびGTC1183は *Streptococcus oralis* のクラスター内に位置し、またGTC1184は *S. sanguinis* のクラスター内に位置していた。このことからGTC1182とGTC1183は *S. oralis*、GTC1184は *S. sanguinis* である可能性が非常に高いと考えられた。

市販の同定キット(ストレプトグラム)による生化学的性状の確認と同定結果ではGTC1183, GTC1184については100%の確率をもって *S. oralis*, *S. sanguinis* と同定さ

れた(表2)。GTC1182については *S. oralis*, *S. mitis* のどちらであるかはっきりとした同定結果とはならなかった。各菌種の陽性率データヘースと比較したところ、陽性率の高い項目で陰性となるケースも見られ、これら3株の生化学性状は、典型性状とはやや異なっていた。

現在の細菌分類学では、基準株と70%以上のDNAホモロジー(類似度)を持つ菌株群を1つの種とすると定義されている。従って基準株DNAと調べようとする菌株DNAを使ってDNA DNA hybridization 試験を行い、そのホモロジーの値を測定すれば、最終的に菌種の同定かできる。今回検討している3株についてマイクロプレート法のDNA DNA hybridization 試験を行い、その菌種名の最終確定を行った(表3)。その結果、GTC1182, GTC1183について自分自身のDNAとのDNAハイブリット形成率を100%とした場合に *S. oralis* の基準株と79%以上のホモロジーを示した。さらに反応温度を10度上げて厳しい条件でも試験を行ったか73%以上のホモロジー値を示した。同様に *S. oralis* の基準株DNAを用いた試験でもGTC1182, GTC1183株は70%以上の値を示した。GTC1184株は *S. sanguinis* と80%以上のホモロジーを示したので、*S. sanguinis* であると確定した。GTC1182, GTC1183は *S. oralis* であると確定した。しかし、遺伝的に *S. oralis* と *S. mitis* は鑑別が難しい事か知られている。実際今回のデータでも *S. mitis* と50-60%程度と若干高めのDNAホモロジーが見られたので、さらに2次元グラフにプロットして確認を行った。図4は横軸に *S. oralis* 基準株DNAとのホモロジー、縦軸に *S. mitis* 基準株DNAとのホモロジーを表したものである。ここにGTC1182, GTC1183株のデータをプロットすると、確かに *S. oralis* 菌株群の中に位置していることか明らかとなった。

### D 考察

BDの病因に口腔連鎖球菌か関与することかこれまで示唆されてきた。さらに、無菌動物に患者由来株を接種すると口腔粘膜病変を形成し、前部フトウ膜炎を起こす

ことが確かめられている。本研究から BD 患者から分離される口腔連鎖球菌は単一ではなく、少なくとも *mitis group* に属する 2 つの菌種が関与することかわかった。このことは、特定の単一菌種が病原菌として発症に関与するというより、そのグループに属する共通した抗原に感作されることによって免疫異常が誘発される可能性を示唆する。

缺ノヨク蛋白は細菌と人との間で高いホモロジーを有すること知られている。これまでに、*mitis group* 以外の *Streptococcus* 属も病因の候補にあげられてきた。このことは缺ノヨク蛋白をはしめとする共通の抗原が発症に関わることを意味するのかもしれない。

う蝕や歯周炎などの口腔疾患では感染すなわち、発症ではない。つまり 特定の菌種が増加することによって はじめて発症にむすひつく。また 菌種は単一ではなく、複数の菌種が関係する Polymicrobial Infection であることが明らかにされつつある BD においても、フローラ中での特定の菌属の増加し、好中球の活性化が起きていることを報告した。これらはアフタ形成に働かなくては 障害を受けた粘膜に働き、全身応答も誘導しうる。実際、モデル動物においてあらかじめ粘膜障害があると全身免疫応答が誘導され、かつ重症化することが示された。

BD 分離株は *S. oralis* および *S. sanguinis* として再同定されたか、一部の生化学的性状などは基準株とは異なっている。これらの BD 患者由来株は独自の生物活性をもち、宿主応答を介して病原性を発揮するのかもしれない。

### E 結論

分子遺伝学的手法、表現形質および DNA DNA hybridization 試験を大し、それらの結果から GTC1182 と GTC1183 株は *Streptococcus oralis* であり、GTC1184 株は *Streptococcus sanguinis* であると結論した。これらはいずれも *mitis group* に属する近縁の菌種であった。

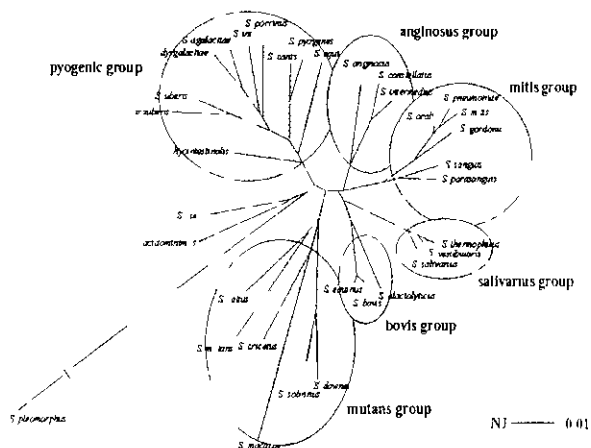


図1 16S rRNA塩基配列に基づくレンサ球菌属の各菌種の系統関係

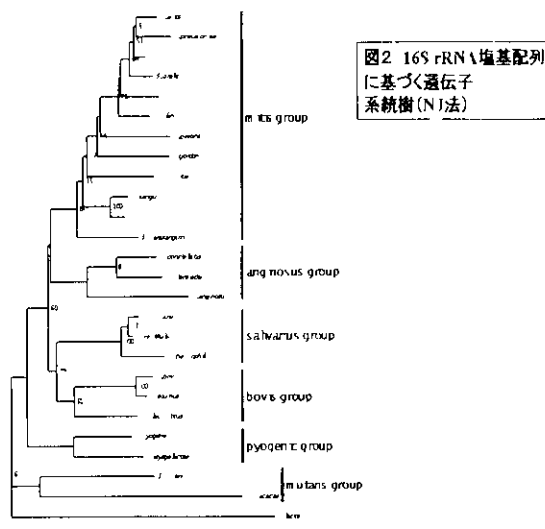


図2 16S rRNA塩基配列に基づくSOD遺伝子系統樹(NJ法)

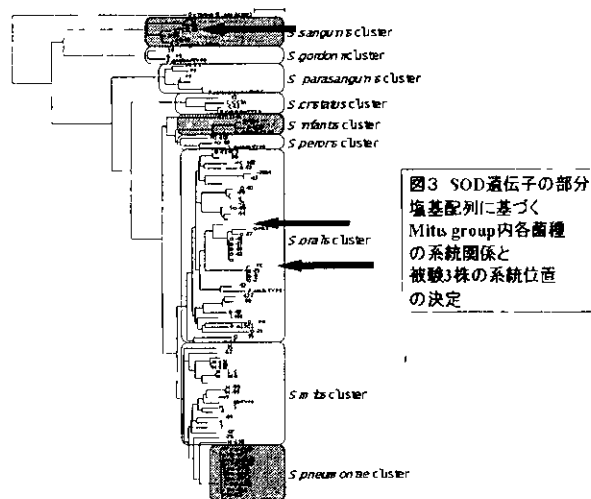
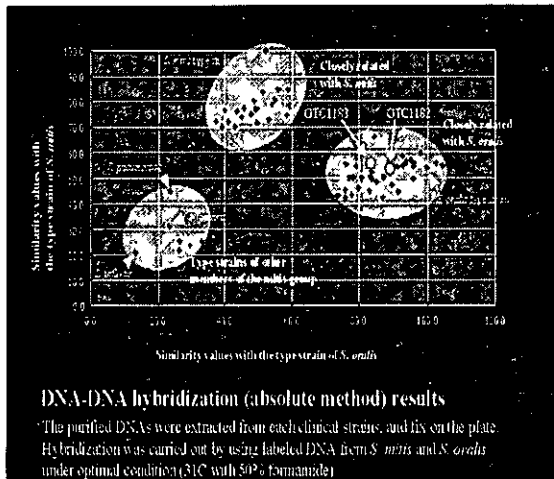


図3 SOD遺伝子の部分塩基配列に基づく Mitis group 内各菌種の系統関係と被験3株の系統位置の決定



**DNA-DNA hybridization (absolute method) results**  
 The purified DNAs were extracted from each clinical strains, and fix on the plate. Hybridization was carried out by using labeled DNA from *S. mitis* and *S. oralis* under optimal condition (31C with 50% formamide)

図4 DNAホモロジーの比較

表2 生化学的性状の確認と同定

反応項目	反応結果		各菌株の陽性率		反応結果		各菌株の陽性率	
	OTC1182	OTC1183	<i>S. oridis</i>	<i>S. mitis</i>	OTC1184	<i>S. sanguinis</i>	<i>S. sanguinis</i>	<i>S. sanguinis</i>
AMYD アミラーゼの陽性反応			1	3				18
LAC ヲク 240の陽性反応			78	84				72
WAG N-アセチルグルコサミンアーゼ			88	19				54
TRE トレハロースの陽性反応			75	7				188
MAN マンニトースの陽性反応			1	0				18
FUCO フェコリンアーゼ			55	18				10
ARBU アルブミンの陽性反応			4	6				45
RAF アルブミンの陽性反応			68	76				23
αGM α-ガラクトシダーゼ			73	12				36
SORT ソルチン 66の陽性反応			0	3				27
ARA アラニン 23の陽性反応			1	45				8
αGM α-ガラクトシダーゼ			3	3				8
IMU イヌリンの陽性反応			3	7				54
NELB ネルビリンの陽性反応			13	59				8
PAL アルカリリンターゼ			91	21				8
ARG アルギニン分解			1	55				8
ESC エステラーゼの加水分解			3	3				188
GM グルコシダーゼの陽性反応			0	0				8
PRN プロテアーゼの陽性反応			0	0				8
HP 脂肪酸の加水分解			0	0				8
VP VPの陽性反応			0	0				8
同定結果	<i>S. oridis</i> 44/25	<i>S. oridis</i> 100/25	<i>S. oridis</i> 100/25	<i>S. mitis</i> 100/25	<i>S. sanguinis</i> 100/25	<i>S. sanguinis</i> 100/25	<i>S. sanguinis</i> 100/25	<i>S. sanguinis</i> 100/25

表3 DNA-DNAハイブリダイゼーション試験におけるハイブリット形成率

Label DNA >	OTC1182	OTC1183	<i>S. oridis</i>	<i>S. mitis</i>	OTC1184	<i>S. sanguinis</i>
Fix DNA	Optimal string	Optimal string	Optimal string	Optimal string	Optimal string	Optimal string
OTC1182	136.0 100.0 79.8 76.8 89.8 84.3			52.6 46.5 18.5 10.3 24.1 14.1		
OTC1183	76.2 73.3 160.6 155.0 82.6 77.6			56.9 49.6 18.9 10.2 17.6 13.1		
OTC1184	16.1 8.9 16.9 8.9 22.6 17.8			16.8 11.4 126.0 183.0 88.1 85.2		
<i>S. mitis</i>	52.6 41.1 16.9 41.9 16.4 11.6			128.6 180.3		9.0 6.1 13.6 7.5
<i>S. oridis</i>	166.3 160.7 79.0 73.7 10.6 86.1			40.4 33.5 6.9 3.9 10.9 4.3		
<i>S. pneumoniae</i>	27.6 19.1 33.9 24.4 14.8 14.3			42.5 47.3 7.7 4.9 8.1 4.9		
<i>S. parvulus</i>	22.9 13.0 24.8 15.3 33.5 23.1			21.1 16.3 9.0 6.3 10.6 7.8		
<i>S. infantis</i>	28.7 18.6 28.5 21.9 42.0 34.7			34.2 23.8 11.9 7.6 13.3 10.2		
<i>S. go. donoff</i>	11.4 6.8 13.0 7.9 17.0 12.1			10.4 7.1 20.5 18.5 27.7 16.7		
<i>S. cristatus</i>	18.1 11.3 19.5 11.7 24.8 21.3			16.9 14.8 30.2 32.1 36.6 32.6		
<i>S. sanguinis</i>	12.4 4.9 13.3 7.3 17.1 13.6			12.0 8.9 84.8 72.7 113.0 136.0		
<i>S. parvaquasi</i>	11.2 4.7 11.4 6.6 12.5 11.1			10.8 6.8 8.7 5.1 9.0 5.2		
Negative cont.	0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0			0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0		

Each value represents the average of three replicate hybridization experiments carried out at 31C (optimal condition) and 41C (stringent condition) at

厚生科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

ヘーチュノト病に関する調査研究

ヘーチュノト病における連鎖球菌HSP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、井上智子、東條理子、中村晃一郎、金子史男

福島県立医科大学 皮膚科学講座

林 松男、小能恵二

岡山大学大学院医歯学総合研究科

研究要旨 ヘーチュノト病（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、これらの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ことで病態解明が期待される。本研究では、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この細菌の（heat shock protein）HSP に注目した。*S. sanguis* HSP を単離同定して決定された塩基配列からヒト HSP 60 と相同性の高い領域および T cell エピトープを含む 6 カ所（LO1、LO2、LO3、III a、III b、UK）に対応する合成ペプチドを作成した。これらのペプチドで BD 患者、健康人の末梢血単核球を刺激した後、血清中の IFN  $\gamma$ 、TNF  $\alpha$ 、IL 8、IL 12 のレベルを ELISA 法を用いて測定した。BD において LO1 刺激による IL 12、LO2 刺激による TNF  $\alpha$ 、UK 刺激による IL 8 で有意な減少を認めた。

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<sup>1</sup>。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<sup>2</sup>。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<sup>3,4</sup>。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 HSP, *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連鎖球菌の HSP に注目し、BD 患者の末梢血単核球（PBMC）の連鎖球菌 HSP 由来ペプチドに対する反応について検討した。

C 方法 BD 患者 7 名、健康人 7 名の末梢血から PBMC を分離し、ペプチド 6 種類（LO1、ADDVDGEALPTLVLNK、

LO2 TIEALGQAARVTVDKD、  
 LO3 ERLAKLSGGVAVIKVGAATE、III a  
 EDALNATRAAVEEGIVAGG、  
 III b GEWVNMIEEGHIDPVKVSRS UK  
 AASVASLILTTEAVV) を併加し、7日後に培  
 養上清中の IFN  $\gamma$ 、TNF  $\alpha$ 、IL8、IL12 を  
 ELISA 法で測定した。

D 結果 BD において、LO1 刺激による IL 12、  
 LO2 刺激による TNF  $\alpha$ 、UK 刺激による IL 8  
 で有意な減少を認めた。その他は有意差を認め  
 ないものの、全体的に健常人と比較して、減少  
 する傾向にあった (図 1~4)。

E 考察 今回は BD 患者 7 名全て、治療後の  
 PBMC を用いての実験を行なったため、健常  
 人と比較して値が低く出た可能性がある。今後  
 は検体数を増やす事で病勢、眼症状、HLA B51  
 などの違いによる影響についてより詳細な解  
 析を行う必要があると考えられる。

F 研究発表 ヘーチェノト柄に関する調査研究  
 平成 15 年度第 2 回研究会 (H15 1 16 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 Bakteriol 1998 287 449-60
- 3) Tojo M, Yanagihori H, Zheng X, Oyama N,  
 Isogai E, Kimura K, Nakamura K, Kaneko F

Bes 1 DNA fragment encoding streptococcal  
 antigen in skin lesions from patients with  
 Behcet's disease J Applied Research 3(3),  
 232-238 2003

- 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 1

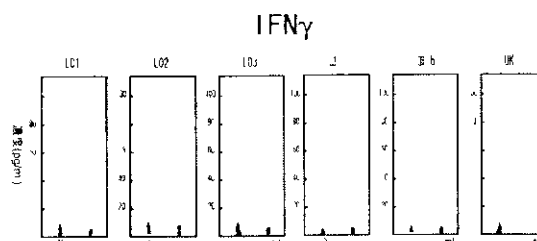


図 2

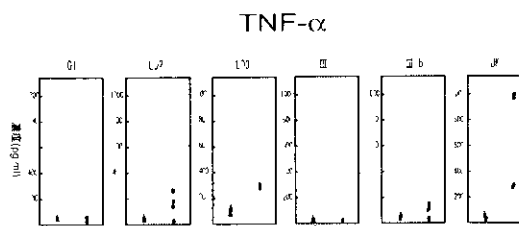


図 3

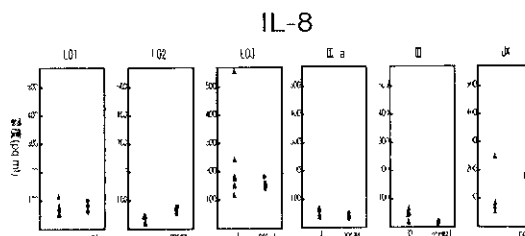
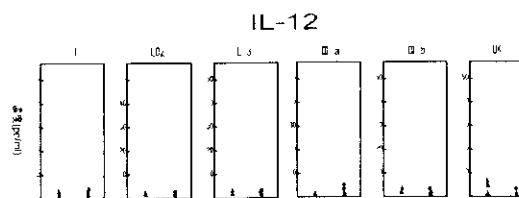


図 4



厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

ヘーチェット病に関する調査研究

分担研究報告書

細菌抗原と疾患発症における意義について

分担研究者 小能恵二 岡山大 大学院医歯学総合研究科・病原細菌学

共同研究者

横田壽治<sup>1)</sup>、林松男<sup>1)</sup>、阪口義彦<sup>1)</sup>、関鋭<sup>1)</sup>、趙瑩<sup>1)</sup>、蔵内智己<sup>2)</sup>、山崎修<sup>3)</sup>、岩月啓氏<sup>3)</sup>、磯貝恵美子<sup>1)</sup>、大野重昭<sup>5)</sup>、金子史男<sup>6)</sup>

岡山大 大学院医歯学総合研究科 病原細菌学<sup>1)</sup>眼科<sup>2)</sup>皮膚粘膜 結合組織学<sup>3)</sup>、北海道医療大学 歯 口腔衛生<sup>4)</sup> 北海道大学大学院医学研究科視覚器病分野<sup>5)</sup>、福島県立医科大学医学部皮膚科学<sup>6)</sup>

研究要旨

ヘーチェット病(BD)患者口腔内より分離した 113-20 株に対する北大、岡大の異なる時期に分離した患者血清中の IgA 抗体価は上昇しており、この菌が広くBD患者の口腔に存在していることが予想された。この菌の菌体抗原(20S 抗原)や熱ショック蛋白質60(HSP60)を用いて、患者リンパ球や単球系細胞株(U937)を刺激すると Th-1 誘導型のサイトカインの産生上昇が認められた。BD患者の中にはピロリ菌の HSP60 に対する IgG 抗体の高い患者が存在し、除菌治療により HSP に対する自己抗体が低下するか検討する必要があると考えられた。

A 研究目的

ヘーチェット病の病態に *Streptococcus* や細菌の熱ショック蛋白質(HSP)が、関係していることを報告してきた。今回、*Streptococcus* や *Helicobacter* の菌体抗原やHSPを用いて、これら抗原に対するBD患者の免疫反応を検討した。

B 方法

1 菌株と細胞

*Streptococcus* の各菌は、5%羊血液加ハートインフュージョン寒天培地または Todd-Hewitt 液体培地で24時間 *H. pylori* (ATCC43504)はフレイnhartインフュージョン寒天培地に馬血液7%を加えたもので好気条件下、37℃で5日間培養した。培養した菌は、それぞれ 4mM PMSF(蛋白質分解酵素阻害剤)を加えたりん酸緩衝生理食塩水(PBS)に懸濁し 超音

波破碎装置で細胞を破壊した。破壊した菌液は 20,000xg で30分遠心し、上清を集めた。タンパク質量を測定後、ELISA およびウエスタンブロッティングの抗原(20S 抗原)に供した。U937 ヒト単球細胞は、日本細胞バンクより購入し、10%FCS 加 RPMI1640 培地で継代培養し、実験に用いた。

2 113-20 および *H. pylori* リコンビナント蛋白質60(rHSP60)の作製

蛋白質の発現はアマナムンヤハンのGST融合蛋白質発現キットを用いた。菌体遺伝子よりPCR法により目的遺伝子を増幅した後、pGEX-5X-3 クローニングベクターに接合し、大腸菌 DH-5 に形質導入した。アンピリン加 LB 培地上でコロニーを選別し、目的の蛋白質を発現しているコロニーを選択し保存した。蛋白質の精製はキットのマニュアルにより行った。IPTG で誘導した大腸菌を25℃で振盪培養した後、遠心により集めた菌を超音波破碎し、Glutathione-spharose4B カラムで精製した。

3 HSP60 合成ペプチドの作製

113-20 株の HSP60 とヒト HSP60 のアミノ酸配列を検討し、抗原性や共通なアミノ酸配列を比較検討し、6つの15-20残基の合成ペプチドを作製した。アミノ酸合成は、Applied Biosystems model 430A synthesizer を用いて固相合成法によった。アミノ酸配列の詳細は、平成15年度報告書に記載した。今回、LO1, IIIb, UK と命名した合成ペプチドをリンパ球の抗原刺激に用いた。

#### 4 ヒト末梢血リンパ球の培養とサイトカインの測定

ヒト末梢血リンパ球は、ヘパリン採血後、Ficoll Paqueにて遠心し、単核球分画を回収した。RPMI1640にて抗原と共に1週間培養後、上清中のサイトカインを測定した。IL-8はTFCHNE社のIL-8 ELISA development kitを用いて、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-12は、Cytometric Bead Array法またはCytoscreen ELISA kitを用いて測定した。

#### C 研究結果

1) ヘーチェット病(BD)患者口腔内より分離した *Streptococcus sanguis* (現在では、*S. sanguinis* と改名されている) 近縁の113-20株とBDの関係。

① 113-20株の抗原(20S)に対する、時期も地域も異なるBD患者群のIgA抗体価は有意に上昇していた。また、ウェスタンブロットにより、抗体価の高い患者が反応する特異な蛋白質が認められた。このことから、113-20株のような菌がBD患者の口腔内に存在している率が高いことが示唆された。(図1)

② *S. sanguis* や113-20菌の抗原(20S)とConAで眼科由来BD末梢リンパ球(PBMC)を刺激したところ、いずれの抗原でもIL-12の有意な産生上昇が認められた。さらに、113-20株抗原刺激はPBMCからのIL-8やIFN- $\gamma$ の産生を強く誘導した(IFN- $\gamma$ は健康人からも誘導された)。IL-12のデータのみを図2に示した。

2) 熱ショック蛋白質(HSP)とBDとの関係。

① 113-20株の抗原(20S)、rHSP60、およびその合成ペプチドに対するBD患者の抗体価を測定したところ、rHSP60およびその合成ペプチドに対する抗体の有意な上昇は認められなかった。

② 皮膚科よりのBD患者リンパ球を、上記の3種の抗原で刺激するとTNF- $\alpha$ の産生が、さらに、20S抗原とrHSP60ではIL-10の産生の誘発も認められたが、合成ペプチドでは認められなかった。(図3)

③ 113-20株のHSP60は、ヒト単球系培養細胞U937細胞からのTNF- $\alpha$ の産生を誘導した。(図4)

④ ヘーチェット病患者の一部では、*H. pylori*のrHSP60に対して高いIgG抗体を産生することが判明した。この免疫反応が、B

D病患者のHSP60を介した自己免疫と関係しているかは不明であるが、*H. pylori*に対する除菌治療は確立しており、安全性は高いことが証明されているため、抗体価の高い患者に対して、抗生物質による除菌治療を試みる価値はあると推測された。

(図5, 6)

#### D 考察

BDの病態には、宿主側の要因と微生物による抗原刺激が深く関わっていると考えられている。今回、口腔内の細菌である *Streptococcus* の113-20株と同じ抗原性を持つ菌がBD患者に広く分布していることが考えられた。またこの菌による患者リンパ球の刺激でTh-1の反応が誘導されやすいと考えられた。

Lehner, 水島らの報告しているヒトHSP60のペプチドは、*Streptococcus* のHSP60よりも大腸菌やヒロリ菌のHSP60と相同性が高いことから、BD患者のピロリ菌およびそのrHSP60に対する抗体価を測定したところ、約1/4の患者でrHSP60に対する抗体価が認められた。これらの患者に除菌を試み、経過を観察する選択肢もあるのではないかと考えられた。

#### E 結論

以下の事が示唆された。

1) 113-20様の菌株はBD患者の口腔に広く分布している(患者は抗菌IgA抗体が高い)。

2) 113-20の抗原やrHSP60の刺激により、BD患者リンパ球やU937細胞よりTh-1誘導型のサイトカインの分泌誘発がおこる。

3) BD患者の一部では *H. pylori* のrHSP60に対して高い抗体価を示した。

図1 BD患者の113-20株に対するIgA抗体

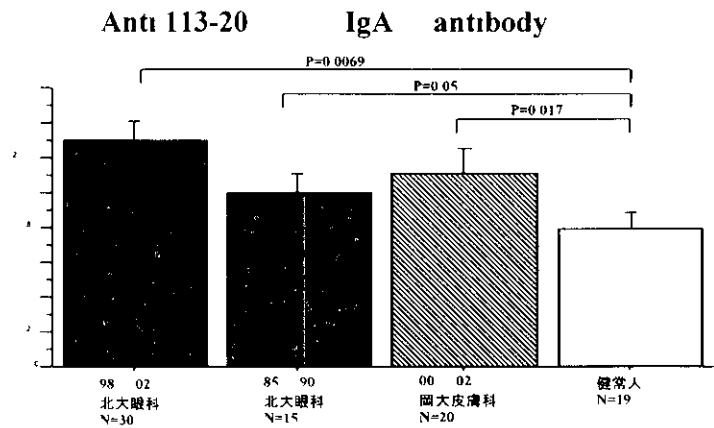


図2 岡大眼科BD患者の113-20抗原刺激に対するIL-12の産生

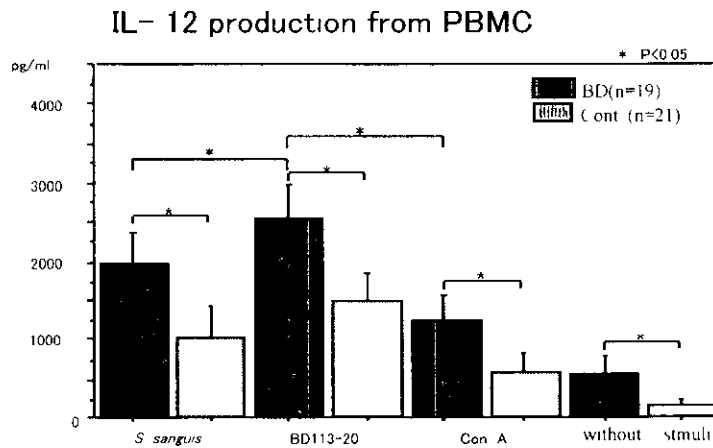


図3 岡大皮膚科患者リンパ球のHSP60とその合成ペプチド刺激に対するIL-10の産生

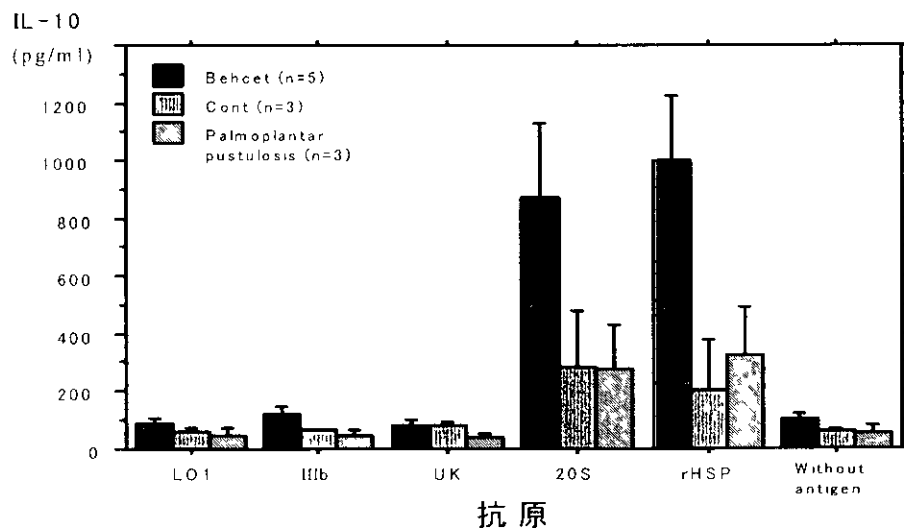




図4 ヒト単核球細胞株よりのHSP60によるINF- $\alpha$ の産生

U937 における 113-20 rHSP60 による TNF- $\alpha$  の産生誘導

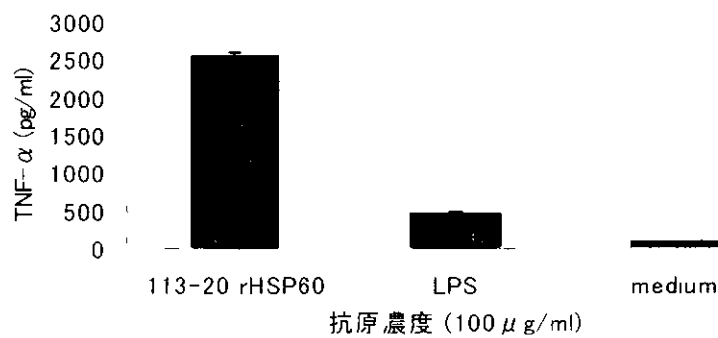


図5 BD患者のピロリ菌に対する抗体価

N 患者数、P 陽性患者数

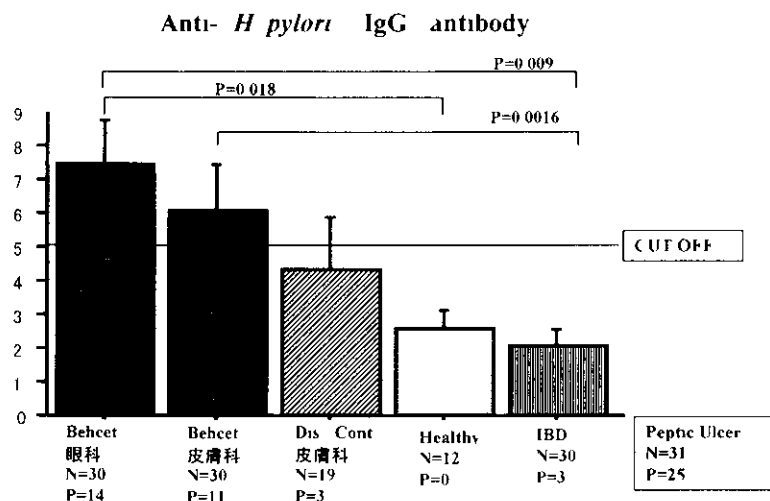
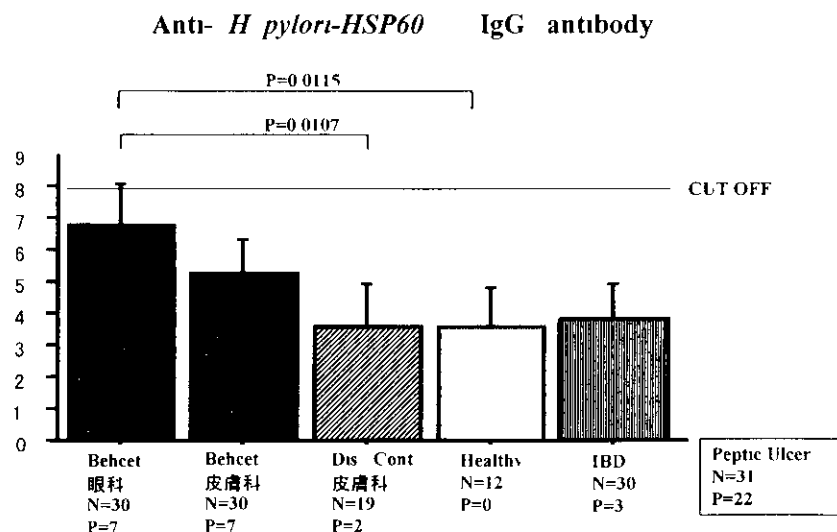


図6 BD患者のピロリ菌HSP60に対する抗体価

N 患者数、P 陽性患者数



厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

ヘーチェット病に関する調査研究  
分担研究報告書

ヘーチェット病の病態形成におけるTh1 細胞の関与に関する研究

分担研究者 鈴木 登 聖マリアンナ医科大学免疫学 病害動物学教授

研究要旨 ヘーチェット病では末梢血、病変組織にTh1型サイトカインの産生亢進を認め、Th1特異的転写因子Txk、Th1型ケモカインレセプターであるCCR5の有意な発現増加を認めた。また、白血球、皮下結節や腸管ヘーチェットの病変部特異的にHSP60の発現を認め、HSP60が関与するTh1優位な免疫現象がヘーチェット病の病態に関わっていることが示された。

A 研究目的

種々の疾患においてTh1/Th2バランスの偏重がそれぞれの疾患特異的な病態を引き起こし、その是正はしばしば有効な治療戦略となる。ヘーチェット病においてTh1/Th2バランスを含め免疫学的病態発現の機序とそれに関わる分子を詳細に調べる事で新たな治療の標的分子や戦略を明らかにしようと試みた。

B 研究方法

ヘーチェット病患者末梢血より末梢血単核球、白血球 血清を分離、また皮下結節の生検検体を採取した。また、腸管ヘーチェットと診断され手術が施行された検体、生検により得られた検体を用いて、RT-PCR法、免疫組織化学を用いることでHSP60、Txk、サイトカイン、およびケモカインレセプターの発現と病変部浸潤細胞の同定を行なった。対照として健常者末梢血 ならびに手術検体正常部および潰瘍性大腸炎の手術検体を用いた。

いずれの検体取得においても、患者への十分な説明の上、同意を得て行なった。

C 研究結果

ヘーチェット病では末梢血白血球、結節性紅斑、腸管病変部においていずれもHSP60の過剰な発現を認めたが、健常者では認めなかった。また、血清中および病変部皮下にIL-12、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ などのサイトカイン産生の優位な増加を認め、病態回復期にはTh1型サイトカインの過剰産生は是正される傾向にあった。

また、末梢血リンパ球はTxkを発現し、CCR5、CXCR3の発現亢進を認め、同様に腸管病変部浸潤細胞はCD4陽性細胞が圧倒的多数を占め、CCR5の発現増強を認めたことから、Th1型細胞の浸潤が示された。

D 考察

ヘーチェット病におけるHSP60の過剰発現は感染症を含めたストレス負荷の存在とHSP60を自己抗原とする自己免疫反応の存在を示唆する。また、末梢血および皮下結節、腸管病変部におけるTh1型サイトカインの過剰産生、多数のTh1細胞の浸潤は、ヘーチェット病の病態におけるTh1/Th2バランスのTh1優位な偏重を示す。これらが明らかになったことにより、ヘーチェット病の新しい治療標的として、Th1特異的転写因子Txk、あるいはTh1優位なケモカインレセプターCCR5、CXCR3の阻害剤などによる治療戦略が試みられる可能性、あるいはHSP60などの抗原による経口寛容の誘導によるTh1優位な過剰免疫反応の抑制などの新規治療法への応用などが考えられる。

E 結論

以上より、ヘーチェット病は、HSP60を含めたTh1優位な自己免疫現象がその本体であり、Th1/Th2バランスの是正を含めた新規治療への応用が期待される。

F 研究発表

1 論文発表

- 1 Nagafuchi H, Shimoyama Y, Kashiwakura J, Takeno M, Sakane T, and Suzuki N Preferential expression of B7 2 (CD86), but not B7 1 (CD80), on B cells induced by CD40/CD40L interaction is essential for the anti-DNA autoantibody production in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 2003;21,71-7
- 2 Suzuki N, Takeno M, Inaba, G Bilateral subdural effusion in a patient with neuro-Behcet's disease. *Ann Rheum Dis* 2003;62 374-5
- 3 Chiba S, Iwasaki Y, Sekino H, Suzuki N Transplantation of motoneuron enriched neural cells derived from mouse embryonic stem cells improves motor function of hemiplegic mice. *Cell transplant* 2003;12 457-68
- 4 Takeno M, Shimoyama Y, Kashiwakura J, Nagafuchi H, Sakane T, Suzuki N Abnormal killer inhibitory receptor (KIR) expression of NK cells in patients with Behcet's disease (BD). *Rheumatol Int*, in press, 2003
- 5 Matsusita S, Suzuki N, Yoshida K, Iwamoto T, Sakane T Evidence for immunosuppressive effects of human semenogelin, a major protein of seminal plasma. *St Marianna Med J*, in press, 2004
- 6 Kurokawa SM, Suzuki N Behcet's Disease. *Clin Exp Med*, in press, 2004
- 7 Nagaya M, Kubota K, Suzuki N, Tadokoro, Akashi K Evaluation of thermoreversible gelatin Polymer (TGP) for regeneration of focal liver injury. *European Surgical Research*, in press, 2004
- 8 Chiba S, Ikeda R, Kurokawa MS, Yosikawa H, Takeno M, Nagafuchi H, Tadokoro M, Sekino H, Hashimoto T, Suzuki N Anatomical and functional recovery by embryonic stem (ES) cell-derived neural tissue of a mouse model of brain damage. *J Neuro Sci*, in press, 2004
- 9 Nagafuchi H, Yoshikawa H, Takeba Y, Nara K, Miura K, Kurokawa SM, Suzuki N Recombination activating genes (RAG) induce secondary Ig gene rearrangement in and subsequent apoptosis of human peripheral blood circulating B lymphocytes. *Clin Exp Immunol*, in press, 2004
- 10 Suzuki N, Takeno M, Takeba Y, Nagafuchi H, Sakane T Autoimmunity in Behcet's disease. *Immunology of Behcet's disease* (Ed by M Zierhut, S Ohno) pp 81-85, Swets & Zeitlinger, Lisse, The Netherlands, 2003
- 11 Takeno M, Shimoyama Y, Nagafuchi H, Suzuki N, Sakane T Neurophil hyperfunction on Behcet's disease. *Immunology of Behcet's disease* (Ed by M Zierhut, S Ohno) pp 97-101, Swets & Zeitlinger, Lisse, The Netherlands, in press, 2003
- 12 Sakane T, Suzuki N Neuro-endocrine-immune axis in human rheumatoid arthritis. *Autoimmunity* Kluwer Academic Publishers, Wroclaw, Poland, in press, 2003
- 13 鈴木登、宮城司 膠原病類縁疾患に伴う関節炎(Behcet病など)「骨関節疾患」, 朝倉書店 印刷中, 2003
- 14 鈴木登 全身性エリテマトーテス 病因 インフォームトコンセントのための図説シリーズ 膠原病, 医葉ジャーナル社 印刷中, 2003
- 15 宮城 司, 本間龍介, 鈴木登 呼吸器系の生物学 1 胚性幹細胞(ES細胞)と実験医学 Annual Review 呼吸器, pp 1-9, 2003
- 16 本間龍介, 鈴木登 再生医療. *Heal Sci* 2003;19 78-9
- 17 濱田真理、鈴木登 ES(胚性幹)細胞ハイオマテリアル 21 218-9, 2003

## 2 学会発表

- 1 本間龍介、上野聡樹、鈴木登 マウス胚性幹細胞(ES)の上皮細胞への分化誘導とその角膜移植への応用、第2回日本再生医療学会総会、2003 3
- 2 宮城司、高橋正知、鈴木登 マウスES細胞から分化誘導した血液血管芽細胞(hemangioblast)の特性、第2回日本再生医療学会総会、2003 3
- 3 濱田真里、千葉俊明、明石勝也、青木治人、鈴木登 マウス胚性幹細胞からの神経幹細胞の分化誘導と脊髄損傷における移植治療の有用性、第2回日本再生医療学会総会、2003 3
- 4 本間龍介、上野聡樹、鈴木登 マウス胚性幹(ES)細胞からの上皮細胞の分化誘導とその角膜移植に関する検討 第97回神奈川県眼科集談会、2003 3
- 5 本間龍介、上野聡樹 坪田一男、鈴木登 マウス胚性幹(ES)細胞の上皮細胞への分化誘導とその角膜移植への応用、第127回日本眼科学会総会、2003 4
- 6 Homma R, Ueno S, Suzuki N Experimental corneal transplantation by using mouse embryonic stem (ES) cell derived epithelial cell sheets Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2003 5
- 7 本間龍介、吉川英志、里川真奈絵、坪田一男 上野聡樹、鈴木登 マウス胚性幹細胞の上皮細胞への分化誘導とその移植による角膜損傷の治療、第24回日本炎症 再生医学会、2003 5
- 8 濱田真理、吉川英志、千葉俊明、明石勝也、青木治人、鈴木登 マウス胚性(ES)幹細胞由来神経幹を用いた脊髄損傷移植治療の有用性、第24回日本炎症 再生医学会、2003 5
- 9 鈴木登 ノノホノウム 3「免疫性神経疾患の新しい治療法」ヘーチェト病の抗サイトカイン療法 第16回日本神経免疫学会学術集会、2004 1
- 10 武水美津子、都倉亨恵、松本香代、北川晶、山口葉子、水島裕、鈴木登、岡野采之、川合眞一、五十嵐理慧 神経幹細胞による外傷性脊髄損傷後の運動機能回復—レ

ノチン化タンパク製剤の有用性— 第3回日本再生医療学会、2004 3

11 他田律子 鈴木登 カニクイサルES細胞の神経幹細胞への分化誘導および大脳損傷モデルへの移植による運動機能改善、第3回日本再生医療学会、2004 3

## H 知的所有権の取得状況

### 1 特許取得

なし

### 2 実用新案登録

なし

### 3 その他

なし