

プルが pooled DNA に適応する病型であった。総サンプル数は目標数に達していないが、274 サンプルの情報を反映するように 100 サンプルを選択し既に一次スクリーニングを開始した。

その結果、既知の第 6 番染色体 HLA-B 遺伝子近傍の MS マーカーについてアリル分布の比較解析では、過去の報告の通り B51 遺伝子と本病との顕著な相関がみられた。このことから今回作成した pooled DNA は解析に適していると判断され、現在 1 次スクリーニングを継続している。これまでに 1 番、2 番、6 番、17 番、19 番の 5 本の染色体に設定した 5546 個の MS マーカーについて 1 次スクリーニングを終了、約 10% の 572 個の MS マーカーが P 値 0.05 未満の陽性を示した（表 2）。各染色体の陽性マーカー数と陽性率は次の通りである。1 番は 87 個（11.9%）、2 番は 150 個（8.0%）、6 番は 127 個（10.4%）、17 番は 51 個（9.5%）および 19 番は 57 個（16.7%）の MS マーカーが陽性であった。

D. 考察

MS は SNP (single nucleotide polymorphism : 1 塩基多型) に比べ遺伝的多型性が豊富で、連鎖不平衡を示す距離も SNP に比べ長いため、より効率的な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。既に我々は 100kb (MS の連鎖不平衡の距離) 每に全ゲノムをカバーする多型性豊富な MS マーカー約 3 万個 ($3.1\text{GB} \div 100\text{kb} = 3.1\text{万個}$) の収集を完了している。したがって、まず MS マッピングを用いて効率的に本病感受性遺伝子の候補領域を 100kb 以内まで絞り込み、次にその絞り込まれた領域内で SNP 解析を行い、疾患感受性遺伝子および疾患特異的な変異の

同定を進めていく予定である。

今回、5 本の染色体で一次スクリーニングが終了し、P 値 0.05 で判定して陽性マーカーは約 10% であった。この中には偽陽性がかなり多く含まれていると考えられる。今後、全ての染色体で一次スクリーニングを終了させ、その後、得られた陽性マーカーから偽陽性の MS マーカーを除外するため、一次スクリーニングと異なる別の 100 人の患者集団を用いて pooled DNA を作成し、同様の解析（二次スクリーニング）を行う予定である。さらに別の患者集団 100 人を用いて pooled DNA を作成し、同様の解析（三次スクリーニング）を行い、3 段階のスクリーニングすべてにおいて陽性となった MS マーカーについてのみ、individual DNA を用いた PCR へとすすめ、疾患遺伝子と相関する真の MS マーカーを決定していく予定である。

E. 結論

患者検体の収集は順調に進行している。今回、第 1 番、2 番、6 番、17 番、19 番の 5 本の染色体で一次 MS スクリーニングが終了し、陽性率は約 10% であった。今後、全染色体を対象に解析を進め、疾患感受性領域を絞り込むことで、多因子性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きたい。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表（平成 16 年度）

特記事項なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記事項なし

表1. サンプル収集状況

横浜市立大学	102	北海道大学	75
久留米大学	1	ゆあさ眼科	39
藤岡眼科	2	ベーチェット病友の会	155
総計 374			

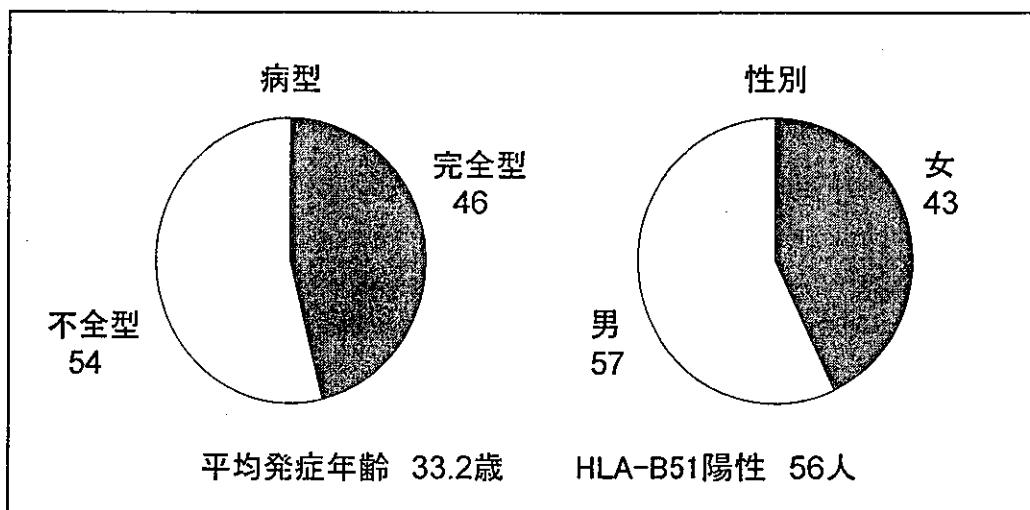


図1. 1次pooled DNA用100サンプル内訳

表2. 1次スクリーニング結果

染色体	マーカー数	Fisher2×2 (P<0.05)	Fisher2×m (P<0.05)	2×2 or 2×m (P<0.05)
Chr.01	1576	186(11.8%)	57(3.6%)	187(11.9%)
Chr.02	1872	149(8.0%)	54(2.9%)	150(8.0%)
Chr.06	1220	127(10.4%)	44(3.6%)	127(10.4%)
Chr.17	536	51(9.5%)	17(3.2%)	51(9.5%)
Chr.19	341	57(16.7%)	22(6.5%)	57(16.7%)
total	5546	570(10.3%)	194(3.5%)	572(10.3%)

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

ベーチェット病の細菌感染における免疫反応と細菌の
熱ショック蛋白質(HSP)の役割に関する研究

分担研究者 小熊恵二 岡山大学大学院医学総合研究科・病原細菌学

研究要旨

北海道のベーチェット病（べ病）患者の口腔内より分離した *Streptococcus* 113-20 株の菌体成分に対しては、北海道の患者のみならず岡山地区の患者も優位に高い IgA 抗体価を示した。また、菌体成分で患者の末梢血を刺激すると、IL-8 の産生と Th-1 関連のサイトカインの上昇が認められた。この株の HSP60 および HSP70 の遺伝子配列を決定した後、これらの蛋白質を大腸菌で発現させ、これら HSP に対する患者の抗体価を測定したところ、抗体価は低く、また、HSP 刺激による患者リンパ球からのサイトカインの産生誘導も弱かった。しかし、HSP は単球系の培養細胞から、TNF や IL-8 の産生を誘導した。

従って、べ病患者では口腔内の *Streptococcus* による免疫刺激により Th-1 有意の免疫反応や好中球の活性化をきたすが、HSP を介した自己免疫の誘導については、他の菌の関与も考えられた。今後、HSP 以外の *Streptococcus* 由来の好中球活性化因子の検索、他の細菌の HSP を介した自己免疫の病態に及ぼす影響なども検討していきたい。

A. 研究目的

これまでベーチェット病(以下べ病)患者から分離した口腔内 *Streptococcus* 113-20 株と病気の関係について研究してきた。今回、この菌で患者リンパ球を刺激し、その產生されるサイトカインについて検討した。また、患者は細菌の熱ショック蛋白質 (HSP) を介した自己免疫反応が病態と関係しているとの報告があるため、113-20 株などのべ病から分離した口腔内の *Streptococcus* の HSP をクローニングし、その塩基配列を決定した。また蛋白質を GST フュージョン蛋白質として発現させ、この蛋白質のべ病の免疫反応との関与について検討した。

B. 研究方法

1. 使用菌株

べ病患者口腔内より分離した 113-20, 114-23, 118-1 株

2. 患者血清

北海道大学付属病院、および岡山大学付属病院で集められた患者血液および血清を用いた。

3. 抗原の作製

上記菌を Todd-Hewitt 培地 (400ml) で 37°C、

24時間培養した後、6,000xg, 20 分間遠心し菌体を得た。上清液に硫酸アンモニウムを 80% に加え、生じた沈殿を 12,000xg, 20 分間遠心して回収した後、0.01M PBS で透析したものを作業上清分画 (Sup) とした。上記遠心により得た菌体を PBS で洗浄し、菌体に同体積のガラスビーズを加え、超音波細胞破碎器で細胞を破碎した。これを 6,000xg, 20 分遠心し、未破碎細胞を取り除き、上清 (20S) を更に 20,000xg, 30 分間遠心し、沈渣を細胞壁分画 (CW) とした。この上清を 45,000xg, 30 分間遠心し、上清を細胞質分画 (CP)、沈渣を細胞質膜分画 (CM) とした。各成分のタンパク量を測定したのち、-30°C に保存した。

4. HSP 遺伝子の全塩基配列の決定とリコンビナント蛋白質の作製

すでに報告されていた *S. pyogenes* の HSP 全塩基配列をもとに作製したプライマーで PCR を行い、HSP60, HSP70 の大部分の塩基配列を決定した。この塩基配列を元に菌のゲノム DNA に対する inversePCR を行い HSP の両端および上流、下流の塩基配列を決定した。リコンビナント蛋白質は、113-20 株の HSP60, HSP70 遺伝子を pGEX-6-P-3 ベクターを介して大腸菌に導入し、GST 融合蛋白質として発現

させた後、Glutathione-Sepharose 4Bカラムにより精製した(rHSP60, rHSP70)。

5. 好中球の活性化およびサイトカインの測定

岡山大学付属病院眼科外来でヘパリン採血した血液に113-20株の20S抗原を加え、ルミノール化学発光により、好中球の活性化を測定した。また同時にリンパ球を分離し、20S抗原を加えて1週間培養し、上清中のサイトカインをELISA法により測定した。

また、岡山大学皮膚科外来でヘパリン採血した血液に113-20株のrHSP60を加え同様に上清中のサイトカインを測定した。

6. 抗体の測定

96穴プレートに、113-20株の20S抗原を40 µg/mlの濃度で固相化し、100倍に希釈した患者血清を反応させた。2次抗体として抗ヒトIgAペルオキシダーゼ標識抗体を反応させ、DAB(5mg/ml)を基質として発色した。Bio-Rad, ELISAリーダーでODを測定し抗体価とした。

7. 单球系細胞に対するrHSP60の作用

U937細胞 (2×10^6 cell/ml) 0.5 mlを24穴プレートで培養し、これに10%FCS加 RPMI1640培地でOD(600nm) 0.01~1.0の間で5段階に懸濁した菌の抗原(CP, CW, CM)各0.5 ml、あるいは、0.5~500 µg/ml間で5段階に希釈・調整したリコンビナント蛋白質各0.5 mlを加え、24時間作用させた。培養上清を集め、TECHNE社のIL-8 ELISA development kitを用いてIL-8産生量を定量した。またU937細胞をPMA(10ng/ml)でマクロファージに分化させた後、抗原刺激しTNFの測定をおこなった。

C. 研究結果

1. 好中球の活性化

患者のヘパリン採血した血液に *Streptococcus* の20S抗原とルミノール試薬を加え、直ちに化学発光を測定した(図1)。ベ病由来の113-20株は、他の口腔内 *Streptococcus* の基準株より、患者と健常人の両者の好中球を強く刺激した。また、好中球の活性化に重要なサイトカインであるIL-8の産生は、患者リンパ球を113-20株で抗原刺激したところ多く産生された(図2)。

図1 菌の抗原刺激による好中球の活性化

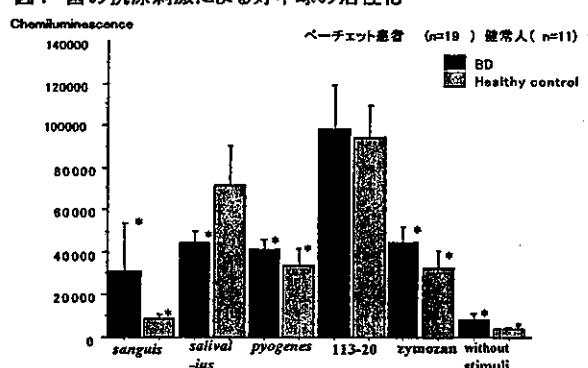
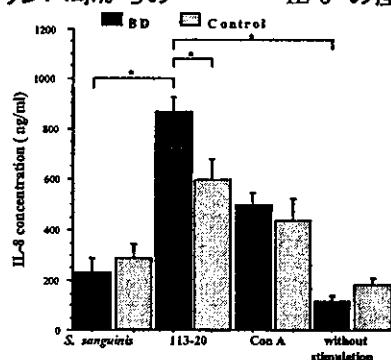


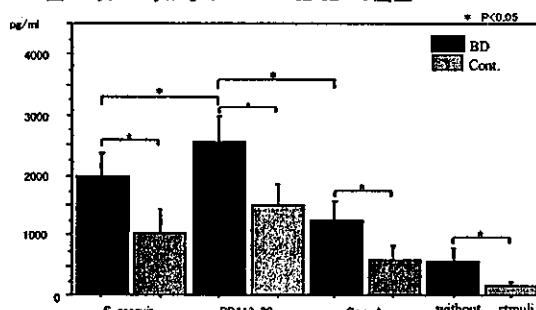
図2 リンパ球からの IL-8 の産生



2. Th-1, Th-2サイトカインの測定

細胞性免疫(Th-1)を強く誘導するIL-12と、細胞性免疫(Th-2)を強く誘導するIL-10の産生を、113-20株で刺激した患者リンパ球で測定した。ベ病患者のリンパ球は、どのような抗原刺激に対しても、健常人に比べIL-12の産生が多い傾向が認められた。113-20株は他の抗原よりIL-12を強く誘導することが認められた(図3)。しかし、IL-10の産生は全体的に少なく、一定の傾向は認められなかった。

図3 リンパ球からの IL-12 の産生

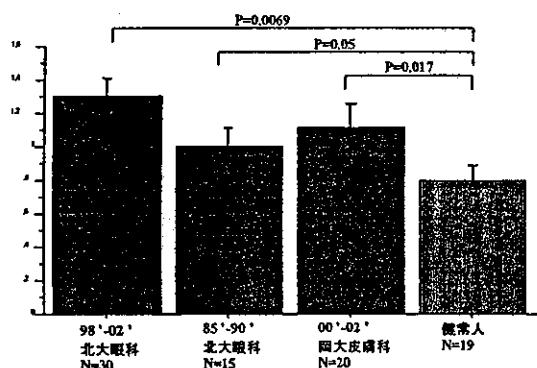


3. 113-20株に対するIgA抗体

実験に使っている113-20株は、約18年前に北海道大学付属病院の眼科患者より分離された菌であるため、現在も、このような菌がベ

病に関係しているのか、北海道大学および岡山大学の比較的新しい患者血清との反応性を検討した。1998～2002年までに北海道大学病院で採血された患者血清、および2000～2002年に岡山大学病院で集められた患者血清とともに抗113-20菌株に対するIgA抗体が認められた。

図4 113-20 株に対する IgA 抗体値



4. HSPの遺伝子クローニング

患者は、HSP60に対する自己免疫が報告されている。113-20株のHSPがこの反応に関与しているか検討するため、113-20株のHSP60遺伝子のシークエンスを行いアミノ酸配列を推定した。表1に113-20株と近縁の口腔内 *Streptococcus*とのHSP60アミノ酸配列の相同性を示した。ほぼ、同じ配列であることが判明した。また、他の菌やヒトのHSP60との比較では、90～50%の相同性であった。

同様にHSP70についても検討したが、ほぼHSP60と同様の結果であった。

表1 113-20-HSP60と近縁の菌とのアミノ酸配列の相同性

菌株	相同性 (%)
114-23 (べ病由来)	98
118-1 (べ病由来)	92
MCLS-1 (川崎病由来)	96
MCLS-2 (川崎病由来)	99
<i>S. sanguinis</i> (ATCC10556)	99
<i>S. oralis</i> (ATCC10557)	92
<i>S. gordinii</i> (ATCC10558)	98

表2 113-20-HSP60と他の菌およびヒトのアミノ酸配列の相同性

菌株	相同性 (%)
<i>S. pneumoniae</i>	97~98
<i>S. salivarius</i>	87
<i>S. pyogenes</i>	87
<i>S. agalactiae</i>	87
<i>E. faecalis</i>	83
<i>S. aureus</i>	69~72
<i>S. epidermidis</i>	69
<i>A. coli</i>	54~62
<i>H. pylori</i>	61
<i>M. bovis</i>	60
<i>Homo sapiens</i>	45~51

5. 大腸菌に発現したrHSPの活性

113-20株より精製した抗原およびrHSP60とHSP70を単球系細胞株であるU937細胞に作用させその活性を検討した。rHSP60, rHSP70共に菌の抗原より強いIL-8産生誘導を示した(図5, 6)。

図5 113-20 株 精製抗原による IL-8 の誘導

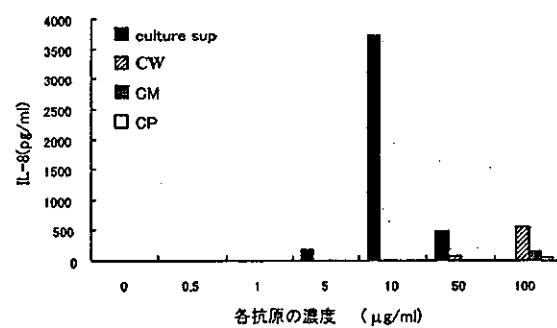
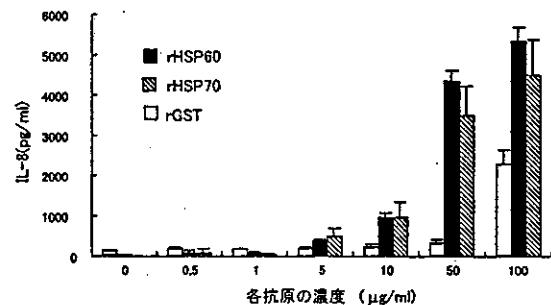


図6 rHSP による IL-8 の誘導



また、PMAでマクロファージ様に分化させたU937細胞からのTNFの産生は、菌の抽出抗原とHSPの両者とも誘導した(図7、8)。

図7 113-20抽出抗原刺激によるTNFの産生

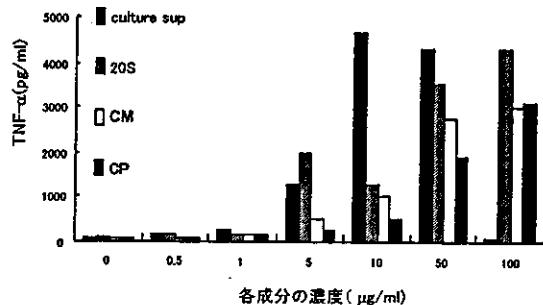
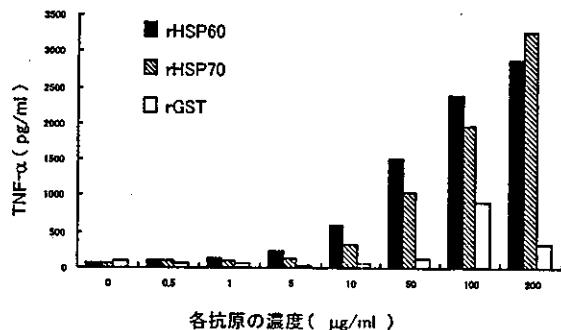


図8 rHSP抗原刺激によるTNFの産生



D. 考察

ベーチェット病(べ病)患者の口腔内より分離した*Streptococcus* 113-20株の菌体成分で、患者の末梢血を刺激し、好中球活性化、リンパ球からのIL-8の産生、Th-1関連のサイトカインの上昇を認めた。更に、時期も地方も異なるベーチェット患者群の113-20株に対するIgA抗体価は有意に上昇していた。これらのことから、113-30株のような好中球やリンパ球を活性化しやすい菌がベーチェット病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。このことは、元々外来抗原に対する過剰な免疫反応を起こしやすい患者の免疫的特徴と合わせたり、病態の形成に重要な役割を演じていると考えられた。また、抗体価の高い患者が、特異的に反応する蛋白質抗原がある可能性があるので、菌の存在を示唆する検査法として使えるかを検討する必要があると思われた。

HSPのリコンビナント蛋白質は、単球系細胞からのTNFやIL-8の産生を誘導した。このことは、菌が何らかの原因で血中に侵入した

ときに、HSPを介した強い炎症反応を誘導する可能性が示唆された。しかしながら、113-20株のHSP60は、他の菌に比べ特別なアミノ酸配列を持たないことから、この菌のHSPによりヒトのHSPに対する自己免疫反応が誘導されたかどうかは不明である。

E. 結論

べ病患者は、口腔内の*Streptococcus*による免疫刺激によりTh-1有意の免疫反応や好中球の活性化をきたす。しかし、HSPを介した自己免疫の誘導については、他の菌の関与も考えられた。今後、HSP以外の*Streptococcus*由来の好中球活性化因子の検索、他の細菌のHSPを介した自己免疫の病態に及ぼす影響なども検討する必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 林松男, 阪口義彦, 関銳, 藤浪良仁, 横田憲治, 磯貝浩, 磯貝恵美子, 小熊惠二: *Streptococcus sanguis* 熱ショック蛋白質60遺伝子の塩基配列のその決定と発現 第75回日本細菌学会総会, 横浜, 日本細菌学雑誌, 57(1), 2002
- 2) 関銳, 林松男, 阪口義彦, 藤浪良仁, 横田憲治, 磯貝浩, 磯貝恵美子, 長町栄子, 小熊惠二: 種々の口腔レンサ球菌の熱ショック蛋白質60遺伝子の塩基配列の決定とその解析 第76回日本細菌学会総会, 熊本, 日本細菌学雑誌, 58(1), 2003
- 3) Tomomi Kurauchi, Kenji Yokota, Toshihiko Matsuo, Yoshihito Fujinami, Emiko Isogai, Hiroshi Isogai, Hiroshi Ohtsuki and Keiji Oguma: Neutrophil and lymphocyte responses to oral *Streptococcus* in Adamantiades-Behcet's disease. FEMS Immunol Med Microbiol, Available online 27 August 2004.
- 4) 関銳: 川崎病とレンサ球菌に関する研究; 特に細菌の膜成分とHSP60に注目して 岡山医学界雑誌 116(2), 125-132, 2004
- 5) Ryuta Takenaka, Kenji Yokota, Kiyoishi Ayada, Motowo Mizuno, Ying Zhao, Yoshihito Fujinami, Song-Nan Lin, Tatsuya Toyokawa, Hiroyuki Okada, Yasushi Shiratori, and Keiji Oguma: *Helicobacter pylori*-heat shock protein 60 induces inflammatory responses through the Toll-like receptor-triggered pathway in

cultured human gastric epithelial cells. Microbiology (in Press)

2. 学会発表

- 1) 磯貝恵美子, 磯貝浩, 木村浩一, 横田憲治, 小熊恵二, G-CSF 遺伝子導入マウスを用いたペーチェット病発症機構の解析 第74回総会, 岡山, 日本細菌誌 56, am186 (2001)
- 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* 热ショック蛋白質60 遺伝子の塩基配列のその決定と発現 第75回総会, 横浜, 日本細菌学雑誌, 57 (1) (2002)
- 3) 磯貝浩, 磯貝恵美子, 小熊恵二, 横田憲治, 林俊治, 西川武志, 納膜抗原および熱ショック蛋白質合成ペプチドに対するペーチェット病患者血清中の抗体応答 第75回総会, 横浜, 日本細菌学雑誌, 57 (1) (2002)
- 4) 関鋭, 林松男, 阪口義彦, 藤浪良仁, 横田憲治, 磯貝浩, 磯貝恵美子, 長町栄子, 小熊恵二 各種々の口腔レンサ球菌の熱ショック蛋白質60 遺伝子の塩基配列の決定とその解析 第76回総会, 熊本, 日本細菌学雑誌, 58 (1) (2003)
- 5) 磯貝恵美子, 磯貝浩, 平田陸正, 松尾幸毅, 小熊恵二 ペーチェット病患者由来口腔ストレプトコッカスに対するCAP18の作用 第76回総会, 熊本, 日本細菌学雑誌, 58 (1) (2003)
- 6) 磯貝恵美子, 松尾幸毅, 磯貝浩, 小熊恵二 ペーチェット病における抗マンナン抗体の検出とマンノース結合タンパクの定量 第77回総会, 大阪, 日本細菌学雑誌, 59 (1) (2004)
- 7) 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, 長町栄子, 小熊恵二 各種々の口腔レンサ球菌の熱ショック蛋白質60 遺伝子の塩基配列の決定とその解析 第55回日本細菌学会中国・四国支部総会 (2002)

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

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

ペーチェット病の皮膚粘膜病変部における熱ショック蛋白の発現について

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
共同研究者 林 松男 岡山大学大学院医歯学研究科皮膚・粘膜・結合織学
山崎 修 岡山大学大学院医歯学研究科皮膚・粘膜・結合織学
森實 真 岡山大学大学院医歯学研究科皮膚・粘膜・結合織学
大野貴司 岡山大学大学院医歯学研究科皮膚・粘膜・結合織学
横田憲治 岡山大学大学院医歯学総合研究科病原細菌学
小熊恵二 岡山大学大学院医歯学総合研究科病原細菌学 教授

研究要旨：ヒトの熱ショック蛋白質(HSP-60、65、70)がブドウ膜炎やペーチェット病の発症に関与しているとする報告がある。また、ストレプトコッカス属はペーチェット病の病因の一つと考えられている。我々はペーチェット病の病態形成においてHSPの関与について検討した。*S. sanguinis*のHSP60、HSP70、ヒトのHSP60のポリクローナル抗体を作製し、ペーチェット病患者の皮膚粘膜病変部（陰部潰瘍、口内炎、毛囊炎様皮疹、結節性紅斑）のパラフィン切片よりHSPの発現を免疫染色法により観察した。結果は*S. sanguinis*のHSP60、70はペーチェット病の皮膚粘膜病変での発現は確認できなかった。

A. 研究目的

ペーチェット病の病態に*Streptococcus*や熱ショック蛋白（HSP）の関与する報告がされてきた。今回ペーチェット病の皮膚粘膜病変におけるHSPの関与を検討した。

B. 研究方法

*S. sanguinis*113-20株のHSP60、HSP70、ヒトのHSP60のポリクローナル抗体を作製し、ペーチェット病患者の皮膚粘膜病変部（陰部潰瘍、口内炎、毛囊炎様皮疹、結節性紅斑）のパラフィン切片よりHSPの発現を免疫染色法により観察した。ELISA法で、作製した各抗体は交叉性がないことを確認した。

（倫理面への配慮）

十分なインフォームドコンセントにより検体をご提供頂いた。

C. 研究結果

免疫染色では*S. sanguinis*のHSP60、HSP70は毛囊炎、外陰部潰瘍、口腔内アフタ、結節性紅斑のいずれの病変部にも発現していなかった。ヒトHSP60は毛囊炎の表皮細胞、外

陰部潰瘍の浸潤細胞に発現していた。

D. 考察

熱ショック蛋白（HSP）は熱刺激などのストレスによって生じる細胞内蛋白で、生体の防御や機能維持に深く関わっており、種を超えてそのアミノ酸配列の相同性がよく保たれている。

HSPは自己免疫疾患と細菌感染を結びつける物質として注目され、微生物の感染に対する免疫反応が細菌由来のHSPとヒトのHSPとの間で交叉反応を起こし、自己免疫反応を引き起こしているのではないかと考えられている。

ヒトのHSPがペーチェット病の皮膚病変で発現している報告はある。我々は113-20株と同じ抗原性を持つ菌がペーチェット病患者に広く分布し、その抗原刺激が深く関わっていると考えているが、現在までの検討では*S. sanguinis*のHSPが皮膚粘膜病変局所での過剰産生はなかった。

E. 結論

*S. sanguinis*のHSP60、70はペーチェット

病の皮膚粘膜病変での発現は確認できなかった。

F. 健康危険情報
特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Oono T, Morizane S, Yamasaki O, Yshirafuji Y, Huh WK, Akiyama H, and Iwatsuki K. Involvement of granulysin-producing T-cells in the development of superficial microbial folliculitis. *Br J Dermatol* 150: 904-909, 2004.
- 2) Akiyama H, Morizane S, Yamasaki O, Oono T, and Iwatsuki K.: Assessment of *Streptococcus pyogenes* microcolony formation in infected skin by confocal laser scanning microscopy. *J Dermatol Sci* 32: 193-199, 2003.
- 3) 林 松男 : *Helicobacter pylori*感染細胞で認められるIL-8の産生誘導におよぼす熱ショック蛋白質の影響. 岡山医学 116: 109-116, 2004.
- 4) Oono T, Huh W-K, Shirafuji Y, Akiyama H, Iwatsuki K.: Localization of human beta-defensin -2 and human neutrophil peptides in superficial folliculitis. *Brit J Dermatol* 148: 171-192, 2003.

2. 学会発表

- 1) 山崎修、森實真、瀬津名美子、大野貴司、岩月啓氏 : 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. 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)
- 2) 山崎修、森實真、大野貴司、岩月啓氏: ベーチェット病における granulysin の関与についての研究. ベーチェット病に関する調査研究平成 15 年度第 1 回研究班会議 (H15.7.18 福島)
- 3) 森實真、山崎修、大野貴司、岩月啓氏、片山治子、小川一行、永田欽也 : ベーチェット病患者における granulysin の血清中濃度について. ベーチェット病に関する調査研究平成 15 年度第 2 回研

究班会議 (H16.1.16 福島)

- 4) T Oono, O Yamasaki, W-K Huh, H Akiyama and K Iwatsuki. Involvement of granulysin -producing T-cells in the development of superficial microbial folliculitis. The Fourth Joint Meeting of the ESDR (European Society for Dermatological Research), JSID (Japanese Society for Investigative Dermatology) and SID (Society for Investigative Dermatology), Miami, April 30-May 4, 2003
- 5) 森實真、山崎修、大野貴司、岩月啓氏、片山治子、小川一行、永田欽也 : ベーチェット病患者における granulysin の血清中濃度について. ベーチェット病に関する調査研究平成 16 年度第 1 回研究班会議 (H16.7.23 福島)
- 6) 森實真、林松男、山崎修、大野貴司、岩月啓氏、金子史男、横田憲治、小熊恵二: ベーチェット病における granulysin の関与についておよび皮膚粘膜病変部における HSP の発現について: ベーチェット病に関する調査研究平成 16 年度第 2 回研究班会議 (H16.11.26 福島)
- 7) 林松男、阪口義彦、関銳、藤波良仁、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 (H14.4.3-5 横浜)
- 8) 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 (H14.6.1-2 徳島)
- 9) 林松男、阪口義彦、関銳、藤波良仁、横田憲治、磯貝浩、磯貝恵美子、長町栄子、小熊恵二: 種々の口腔レンサ球菌の熱ショック蛋白質 60 遺伝子の塩基配列の決定とその解析: 第 55 回日本細菌学会中国・四国支部総会 (H14.10.17-18 岡山)

H. 知的財産権の出願・登録状況
特記事項なし

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

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	福島県立医科大学 皮膚科学講座
	井上智子	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
	金子史男	福島県立医科大学 皮膚科学講座
	小林とも子	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
	小林憲太	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

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、これらの遺伝的背景をもとに様々な環境要因や外的因子が 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に外的因子を付加する事で病態解明が期待された。しかし、これまでの解析では、BD 外的因子候補とされる *S. sanguinis* の heat shock protein は BD 発症に直接関係しない可能性が示唆されてきた。一方で、今後、様々なアプローチにより BD 発症と関係する遺伝子の候補があげられてくる可能性がある。これらの候補遺伝子の生体内における役割や病態との関係を研究するためには、皮膚や網膜に効率よく遺伝子を導入する実験系の開発が重要である。この目的のためには、組み換え体ウイルスを用いた遺伝子発現系が有益と考えられる。今回我々は、組み換え体の非増殖型レンチウイルス（理化学研究所・バイオリソースセンター・三好浩之博士より分与）を利用して、GFP などのマーカー遺伝子を皮膚や網膜に効率よく導入する実験系を確立した。

A. 背景: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 (図 1)。これまで我々は外的因子候補とされる *S. sanguinis* の heat shock protein に注目して研究を行なってきたが、これまでの解析では、*S. sanguinis* の heat shock protein は BD 発症に直接関係しない可能性が示唆されてきた。一方で、今後、様々なアプローチにより BD 発症と関係する遺伝子の候補があげられてくる可能性がある。これらの候補遺伝子の生体内における役割や病態との関係を研究するためには、皮膚や網膜に効率よく遺伝子を導入する実験系の開発が重要である。

B. 研究目的:今回我々は BD 発症の候補遺伝子をマウスに効率よく導入する方法の開発を目的として、レンチウイルスによる遺伝子導入を試みた。

C. 方法:Packaging Plasmid, Envelope-REV Plasmid, SIN Vector Plasmid の 3 種類のプラスミドを、リン酸カルシウム法を用いて HEK293T 細胞にトランスフェクションした後、上清を回収した。上清を濃縮して、ウイルスをマウス耳介の皮下に注入した。1 週間後表皮シートを作成し、蛍光を確認した (図 2)。

D. 結果:表皮シートでは、ウイルスの注入部位に一致して GFP の蛍光が確認できた (図 3)。

E. 考察：今回はレンチウイルスを用いて、皮膚に効率よく遺伝子導入することに成功した。レンチウイルスは非分裂細胞にも遺伝子導入が可能であり、その遺伝子発現も安定している（図4）。このため、今後は今回用いたGFPの代わりにBDの発症に関係のある遺伝子を遺伝子改変マウスに比べ安価で、短期間に解析が可能となった（図5）。

F. 研究発表：ベーチェット病に関する調査研究平成16年度第2回研究会(H16.11.26 福島)

G. 図の説明

図1：これまでのBD発症モデルマウスの遺伝子的背景と外的因子

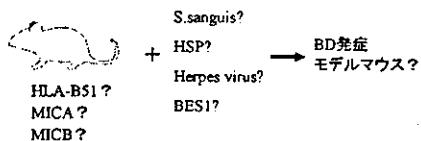
図2：方法とPackaging Plasmid, Envelope-REV Plasmid, SIN Vector Plasmidの構成

図3：結果、ウイルスの注入部位に一致してGFPの蛍光が確認できる（倍率：右x100、左x400）

図4：これまで報告のあるウイルスベクターの特徴

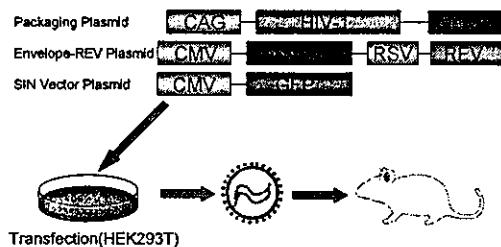
図5：今後の展望

図1 遺伝的背景と外的因子の負荷



方 法

図2



結 果

図3

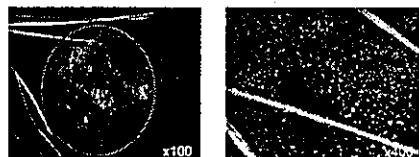
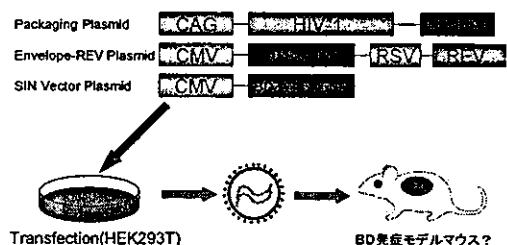


図4 代表的なウイルスベクターの特徴

	レトロウイルス	レンチウイルス	アデノウイルス	アデノ関連ウイルス
野生型ウイルスの 病原性	あり	あり	あり	なし
ウイルスゲノム	RNA	RNA	2本鎖DNA	1本鎖DNA
分裂細胞へ遺伝子導入	可能	可能	可能	可能
非分裂細胞へ遺伝子導入	不可能	可能	可能	可能
遺伝子表現	安定？	安定	一過性	比較的安定

今後の展望

図5



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

ペーチェッ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研究科皮膚・粘膜・結合織学 教授
共同研究者 山崎 修 岡山大学大学院医歯学研究科皮膚・粘膜・結合織学
森實 真 岡山大学大学院医歯学研究科皮膚・粘膜・結合織学
大野貴司 岡山大学大学院医歯学研究科皮膚・粘膜・結合織学
金子史男 福島県立医科大学皮膚科 教授

研究要旨： GranulysinはT細胞、NK細胞より放出されるタンパクで、細菌、真菌、ウイルスなどに対し強力な抗菌活性を有するとともに、細胞傷害分子としての機能も有し、ウイルス感染細胞や腫瘍細胞のapoptosisを誘導する。我々はペーチェット病の病態、病変形成におけるgranulysin発現リンパ球の関与について研究した。免疫染色では毛嚢炎、口腔内アフタ、外陰部潰瘍にgranulysin陽性細胞を認めた。結節性紅斑では陽性細胞を認めなかった。また、ELISAによりgranulysinの血清中濃度を測定した。33例中1例に異常高値を認めたが、その症例にペーチェット病の活動性、感染徵候は認めなかった。Granulysin発現リンパ球が皮膚粘膜病変形成に関与していると推測した。

A. 研究目的

ペーチェット病の病変部に浸潤する細胞は主に好中球であるが、多数のリンパ球の浸潤も認める。GranulysinはT細胞、NK細胞より放出されるタンパクで、細菌、真菌などに対し強力な抗菌活性を有するとともに抗ウイルス活性についても報告されている。また、細胞傷害性T細胞の活性を示す指標とも考えられている。我々はペーチェット病の病変形成と、本症における細胞障害性T細胞活性を評価するマーカーとしてのgranulysinの関与について研究した。

B. 研究方法

ペーチェット病の皮膚・粘膜病変（毛嚢炎4例・口腔内アフタ3例・陰部潰瘍3例・結節性紅斑9例）におけるgranulysinの発現を免疫染色法で検討した。Granulysinマウスモノクローナル抗体（Los Angeles大学 Modlin教授より分与）を使用した。

さらにgranulysinを発現している細胞を同定するためgranulysinとリンパ球表面マーカー（CD3、4、8）をそれぞれビオチン標識二次抗体とFITC標識二次抗体を用いて二重染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

また岡山大学医学部歯学部附属病院、岡山

済生会総合病院、福島医科大学附属病院に通院するペーチェット病の患者33例について、血清中granulysin濃度をELISAによって測定した。測定はBML先端医療開発部に依頼した。

（倫理面への配慮）

十分なインフォームドコンセントにより検体をご提供頂いた。

C. 研究結果

免疫染色では毛嚢炎、外陰部潰瘍、口腔内アフタにおいてほぼ全例の浸潤細胞にgranulysinが発現していたが、結節性紅斑では発現していなかった（表1）、（図1～4）。

共焦点レーザー顕微鏡による観察では毛嚢炎においてgranulysinがCD4陽性T細胞に発現していた。

血清中granulysin濃度は33例の平均値は5.73ng/mlでは正常範囲内（健常人の平均は3.7ng/ml）であった。1例のみ56.74ng/mlと高値を示したが、この症例は採血時、ペーチェット病の活動性はほとんどなく、また急性ウイルス感染症を疑う臨床症状、血液学的データも全く認めなかった。

D. 考察

Granulysinは強力な抗菌活性以外に腫瘍細胞やウイルス感染細胞のアポトーシスを誘導するとも報告されている。

我々の行った免疫染色ではペーチェット病患者の毛囊炎、口腔内アフタからgranulysinの発現が確認され、病変部形成に関与している可能性が示唆された。しかしながら結節性紅斑部ではgranulysinは発現を認めなかった。これらの結果は、本症における毛囊炎や口腔内アフタと外陰部潰瘍の形成には細胞傷害性T細胞が関与しているが結節性紅斑の形成は組織病因的には異なる機序が働いている可能性を示唆する。

Granulysinの血清中濃度は急性ウイルス感染症などで一過性に高値を示すとされている。今回の測定では33例中1例に高値を認めたがペーチェット病の活動性なく、急性ウイルス感染症を示唆する所見もなく原因が不明であった。Granulysinは局所での発現はあるものの一つの指標としては利用できないと考えた。活動性のある病期の測定も行い、ペーチェット病におけるgranulysin発現リンパ球の病因的意義との関連を評価する必要があると考えられた。

E. 結論

ペーチェット病の毛囊炎、外陰部潰瘍、口腔内アフタでgranulysinの発現を認めた。しかし結節性紅斑部のリンパ球にはgranulysinの発現は認めなかった。Granulysin発現リンパ球が皮膚粘膜病変形成に関与していると推測した。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Oono T, Morizane S, Yamasaki O, Yshirafuji Y, Huh WK, Akiyama H, and Iwatsuki K. Involvement of granulysin-producing T-cells in the development of superficial microbial folliculitis. Br J Dermatol 150: 904-909, 2004.
- 2) Akiyama H, Morizane S, Yamasaki O, Oono

T, and Iwatsuki K.: Assessment of *Streptococcus pyogenes* microcolony formation in infected skin by confocal laser scanning microscopy. J Dermatol Sci 32: 193-199, 2003.

- 3) Akiyama H, Hamada T, Huh W-K, Yamasaki O, Oono T, Fujimoto W and Iwatsuki K.: Confocal laser scanning microscopic observation of glycocalyx production by *Staphylococcus aureus* in skin lesions of bullous impetigo, atopic dermatitis and pemphigus foliaceus. Brit J Dermatol 148: 526-532, 2003.
- 4) Oono T, Huh W-K, Shirafuji Y, Akiyama H, Iwatsuki K.: Localization of human beta-defensin -2 and human neutrophil peptides in superficial folliculitis. Brit J Dermatol 148: 171-192, 2003.

2. 学会発表

- 1) Yamasaki O, Iwatsuki K, Kaneko F: A case of SAPHO syndrome with pyoderma gangrenosum and inflammatory bowel disease masquerading Behcet's disease 10th International Conference on Behcet's Disease. (2002.6 in Berlin)
- 2) 山崎修、森寛真、大野貴司、岩月啓氏:ペーチェット病におけるgranulysinの関与についての研究. ペーチェット病に関する調査研究平成15年度第1回研究会議 (H15.7.18福島)
- 3) 森寛真、山崎修、大野貴司、岩月啓氏、片山治子、小川一行、永田欽也:ペーチェット病患者におけるgranulysinの血清中濃度について. ペーチェット病に関する調査研究平成15年度第2回研究会議 (H16.1.16福島)
- 4) Oono T, Yamasaki O, Huh WK, Akiyama H, and Iwatsuki K. Involvement of granulysin-producing T-cells in the development of superficial microbial folliculitis. The Fourth Joint Meeting of the ESDR (European Society for Dermatological Research), JSID (Japanese Society for Investigative Dermatology) and SID (Society for Investigative

Dermatology), Miami, April 30-May 4,
2003

- 5) 山崎修、森実真、大野貴司、岩月啓氏、片山治子：ペーチェット病患者における*granulysin*の血清中濃度について。ペーチェット病に関する調査研究平成16年度第1回研究班会議（H16.7.23 福島）
- 6) 森實 真、林 松男、山崎 修、大野貴司、岩月啓氏、金子史男、横田憲治、小熊恵二：ペーチェット病における*Granulysin*の関与についておよび皮膚粘膜病変部におけるHSPの発現について：ペーチェット病に関する調査研究平成16年度第2回研究班会議（H16.11.26 福島）

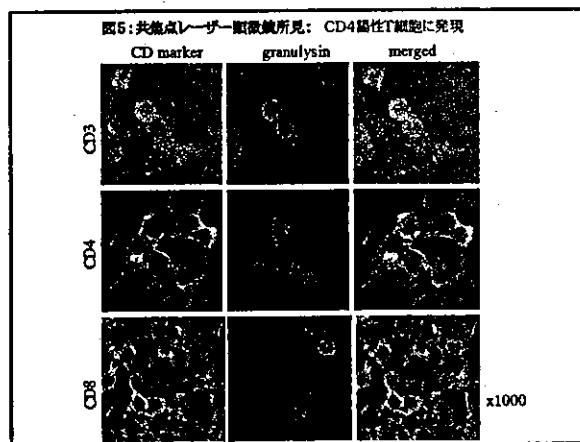
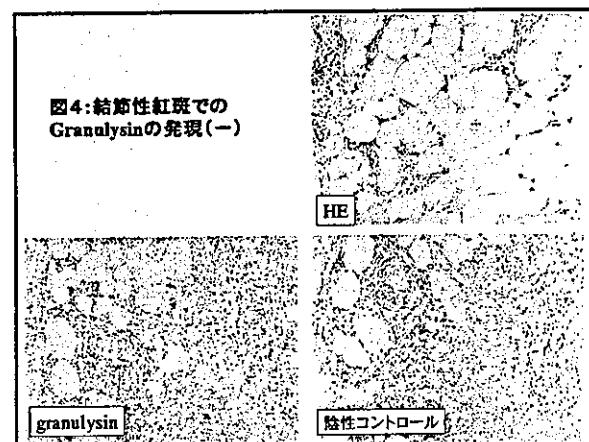
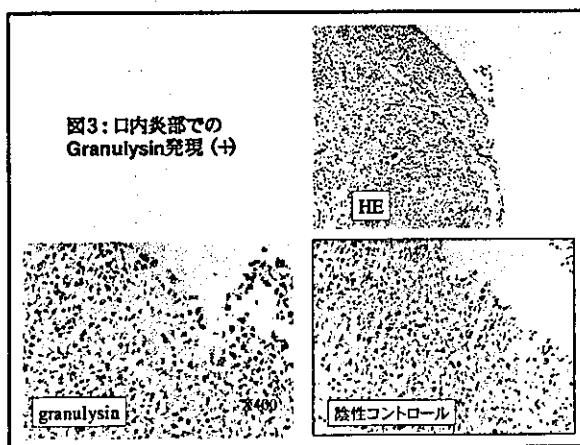
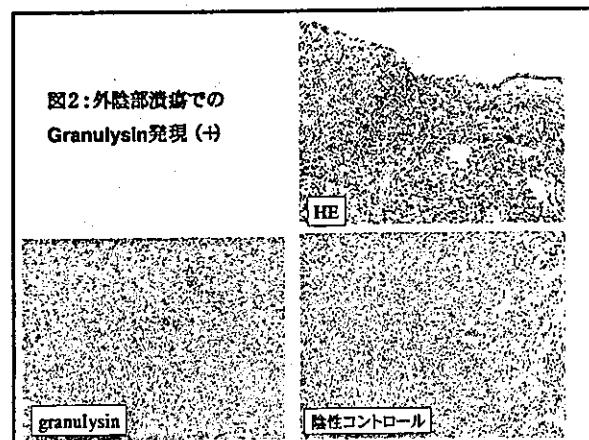
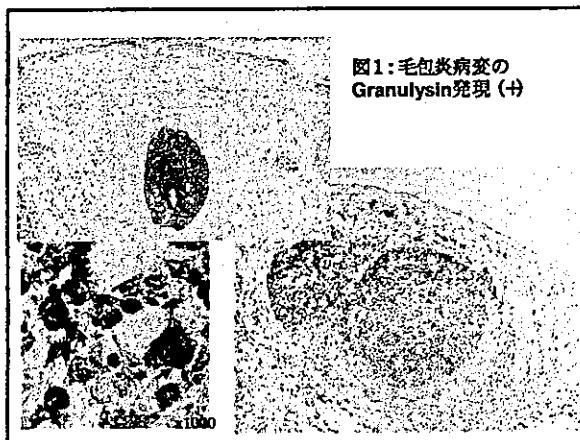


表1:ペーチェット病の皮膚粘膜病変部におけるgranulysinの発現	
診断	
毛嚢炎	4/4
外陰部潰瘍	3/3
口内炎	3/4
結節性紅斑	0/9

厚生労働科学研究補助金（難治性疾患克服研究事業）分担報告書
ベーチェット病症例における Toll like receptor 9 遺伝子変異・多型の検索

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教授

研究要旨：昨年度の報告で、BD 症例 PBMC は、健常人 PBMC に比し CpG DNA に対する反応性が高いことを示した。CpG DNA は APC の Toll like receptor 9 (TLR9) を介して免疫を活性化させることから、BD 症例の TLR9 の構造または機能に異常がある可能性が推測された。BD 症例 25 名、健常人 33 名を対象として TLR9 遺伝子変異・多型の検索を行った結果、5 つの SNP (-1923:C/A, -1837:C/T, -1486:T/C, 1174:A/G, 2849:G/A) を検出した。健常人と比較していずれの SNP においてもアリル頻度に統計学的有意差が認められなかつたが、BD 症例において -1486:C, 1174:G, 2849:A のアリル頻度が多い傾向が認められ、かつ -1486:C, 1174:G, 2849:A のホモでのハプロタイプの組み合わせ (C-G-A/C-G-A) が多く存在する傾向が認められた。これらの結果は、TLR9 の発現レベルや CpG DNA に対する感受性等に関与している可能性が推測された。

共同研究者

小林 浩子 福島県立医科大学第 2 内科助手
関根 英治 福島県立医科大学第 2 内科助手
坂本 夏美 福島県立医科大学第 2 内科大学院生

A. 研究目的

これまでに我々はベーチェット病 (BD) 症例の末梢血単核球を非メチル化 CpG DNA で刺激し細胞増殖 assay を行うと、健常人のそれと比べて CpG DNA に対する反応性が高まっていることを報告した (平成 15 年度ベーチェット病に関する調査研究報告書)。CpG DNA は TLR9 を介して強い免疫活性化作用を示すとされていることから、BD 症例の TLR9 に何らかの異常または変異がある可能性が推測された。そこで我々は BD 症例および健常人における TLR9 遺伝子の変異または多型を、末梢血単核球から抽出した genomic DNA をもとに direct sequencing 法にて検索し、その解析を行つた。

B. 研究方法

当施設に通院中または入院中の BD 症例 25 名、健常人 33 名を対象として TLR9 のゲノム塩基配列を解読し、変異または多型の検出を行つた。また、データベースに登録してある塩基配列と比較し、これまでの報告と比較した。具体的には以下の手順に従つて解析を行つた。

- 1) ベーチェット病症例および健常人の末梢血単核球を分離し、genomic DNA を抽

出。

- 2) 9 つの primer set を用い、PCR 法にて TLR9 genomic DNA 断片を增幅。
- 3) Direct sequencing にて塩基配列を解読。
- 4) BD 症例と健常人およびデータベース上の塩基配列と比較・検討。

(倫理面への配慮)

当研究は、当大学の倫理委員会の承認を得、検体および情報の取り扱いについては倫理委員会の定める規定に従つた。

C. 研究結果

BD25 症例中 8 症例において、プロモーター領域を含む TLR9 の全域の塩基配列の解読を終え、プロモーター領域に 3 つ (-1923:C/A, -1837:C/T, -1486:T/C)、インtron 領域に 1 つ (1174:A/G)、エクソン領域に 1 つ (2849:G/A)、計 5 つの SNP を検出した (図 1)。エクソン領域の SNP 2849:G/A は、アミノ酸変異を伴わない silent SNP であった。頻度の多い SNP、-1486:T/C, 1174:A/G, 2849:G/A について解析を進めた結果、それぞれのアリル頻度に BD 症例と健常人間で統計学的有意差が認められなかつたが、BD 症例において健常人及びデータベース登録例に比し、-1486:C, 1174:G, 2849:A のアリル頻度が多い傾向が認められた (図 1, 図 2)。さらにこれらの SNP について解析ソフトウェアによるハプロタイプ解析を行つた結果、確率的には 8 通りのハプロタイプが推定されるが、連鎖不平衡の存在により BD 症例では 2

通り、健常人では4通りのハプロタイプが推定された(表1,2,図3)。さらに各検体でのハプロタイプの組み合わせを検討した結果、BD症例ではC-G-A/C-G-Aのホモの組み合わせが多く(BD:44.0%, control:21.2%)、コントロールではC-G-A/T-A-Gのヘテロの組み合わせが多い傾向を示したが(BD:32.0%, control:54.5%)、統計学的有意差はみられなかった(図4)。

D. 考察

今回の検討では、統計学的な有意差はみられなかつたものの、BD症例において、健常人およびデータベース登録例に比し、TLR9のSNP -1486:C, 1174:G, 2849:Aのアリル頻度が多い傾向が示された。ハプロタイプ解析の結果、BD症例においてC-G-A/C-G-Aのホモの組み合わせが多い傾向が示された。^{-1486:C}はプロモーター領域に、^{1174:G}はイントロン領域に、^{2849:A}はエクソン領域にそれぞれ存在していた。これまでの我々の解析結果より、BD症例の末梢血単核球は健常人のそれと比べて CpG DNAに対する反応性が高まっていることから、それらのハプロタイプが TLR9の発現やCpG DNAに対する感受性等に何らかの関与を示している可能性が推測された。今後は症例数を増やし、関節リウマチ等他の慢性炎症性疾患等とも比較検討していきたい。また、BD症例の末梢血単核球でのTLR9の発現レベルの検討も考慮していきたい。

E. 結論

BD症例において、TLR9のSNP -1486:C, 1174:G, 2849:Aのアリル頻度が多い傾向が示され、これらのSNPにおいてC-G-A/C-G-Aのホモのハプロタイプの組み合わせが多い傾向が示された。これらの結果は、TLR9の発現レベルやCpG DNAに対する感受性等に関与している可能性が推測された。

F. 健康危険情報

特記すべき事なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Tojo J, Ohira H, Abe K, Yokokawa J, Takiguchi J, Rai T, Shishido S, Sato Y, Kasukawa R. Autoimmune hepatitis accompanied by systemic lupus erythematosus. Internal Med, 43 (3), 258-262, 2004.

Ohira H, Takiguchi J, Rai T, Abe K, Yokokawa J, Sato Y, Takeda I, Kanno T. High frequency of anti-ribosomal P antibody in patients with systemic lupus erythematosus-associated hepatitis. Hepatol Res, 28(3), 137-139, 2004.

Hashimoto T, Sugino T, Fukuda T, Hoshi N, Ogura G, Watanabe K, Sato Y, Hasegawa T, Ohishi A, Haga J, Suzuki T. Multiple epithelial cysts of the spleen and on the splenic capsule, and high serum levels of CA19-9, CA 125 and soluble IL-2 receptor. Pathol Int, 54, 349-354, 2004.

Rai T, Ohira H, Tojo J, Abe K, Yokokawa J, Takiguchi J, Shishido S, Sato Y. Expression of human glucocorticoid receptor in lymphocytes of patients with autoimmune hepatitis. Hepatol Res, 29 (3), 148-152, 2004.

Watanabe H, Seino T, Sato Y. Antibodies to triosephosphate isomerase in patients with neuropsychiatric lupus. Biochem Bioph Res Co, 321, 949-953, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

図1

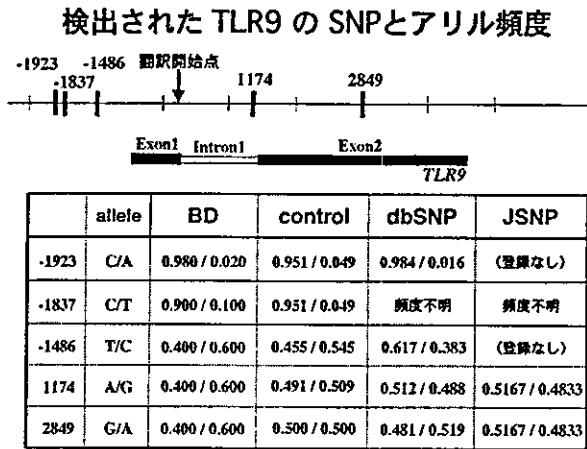


表1

	BD	-1486	1174	2849
1	homo	CC	GG	AA
2	homo	CC	GC	AA
3	homo	CC	GG	AA
4	hetero	TC	AG	CA
5	homo	CC	GG	AA
6	homo	CC	GG	AA
7	homo	CC	GG	AA
8	homo	TT	AA	GG
9	homo	CC	GG	AA
10	hetero	TC	AG	GA
11	hetero	TC	AG	GA
12	homo	CC	GG	AA
13	homo	TT	AA	GG
14	hetero	TC	AG	GA
15	hetero	TC	AG	GA
16	hetero	TC	AG	GA
17	homo	TT	AA	GG
18	hetero	TC	AG	GA
19	homo	CC	GG	AA
20	homo	TT	AA	GG
21	hetero	TC	AG	GA
22	homo	TT	AA	GG
23	homo	CC	GG	AA
24	homo	TT	AA	GG
25	homo	CC	GG	AA

図2

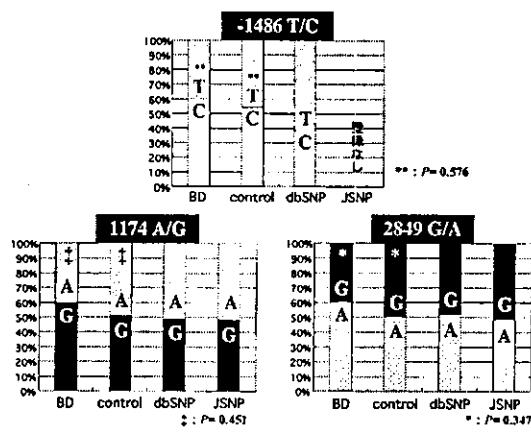


表2

	Control	-1486	1174	2849
1	hetero	TC	AG	GA
2	homo	CC	GG	AA
3	homo	CC	GG	GA
4	hetero	TC	AG	GA
5	homo	TT	AA	GG
6	hetero	TC	AG	GA
7	homo	TT	AA	GG
8	hetero	TC	AG	GA
9	hetero	TC	AG	GA
10	hetero	TC	AG	GA
11	hetero	TC	AG	GA
12	hetero	TC	AG	GA
13	homo	CC	GG	AA
14	homo	CC	GG	AA
15	homo	TT	AA	GG
16	hetero	TC	AG	GA
17	homo	TT	AA	GG
18	hetero	TC	AG	GA
19	homo	CC	GG	AA
20	homo	CC	GG	AA
21	hetero	TC	AG	GA
22	hetero	TC	AG	GA
23	homo	TT	AA	GG
24	homo	CC	GG	AA
25	hetero	TC	AG	GA
26	hetero	TC	AG	GA
27	hetero	TC	AG	GA
28	hetero	TC	AG	GA
29	hetero	TC	AG	GA
30	hetero	TC	AG	GA
31	homo	CC	GG	AA
32	homo	TT	AA	GG
33	hetero	TC	AG	GA

図3

Haplotype 解析結果 (I)

	-1486	1174	2849	N	Frequency
BD	C G A			29 / 50	0.580
	T C A	G C		21 / 50	0.420
Control	C G A			33 / 66	0.500
	T C A	G C		30 / 66	0.455
	C A G			2 / 66	0.030
	C G G			1 / 66	0.015

Haplotype 解析結果 (II)

	Haplotype 1	Haplotype 2	N	Frequency
BD	C G A	T A G	11 / 25	0.440
	C G A	T A G	8 / 25	0.320
	T A G	T A G	6 / 25	0.240
Control	C G A	T A G	18 / 33	0.545
	C G A	C G A	7 / 33	0.212
	T A G	T A G	5 / 33	0.152
	T A G	C A G	2 / 33	0.061
	C G A	C G G	1 / 33	0.030

P = 0.229

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

ベーチェット病に関する調査研究

Behcet 病における IL-12p40 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教室教授
共同研究者	柳堀浩克	福島県立医科大学 皮膚科学講座
	井上智子	福島県立医科大学 皮膚科学講座
	尾山徳孝	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
	西田朋美	横浜市立大学 医学部眼科
	水木信久	横浜市立大学 医学部眼科

研究要旨 Behcet 病 (BD) における慢性炎症に Th1 型サイトカインが重要な役割を果たしている。我々は前回の班会議でこれら Th1 型サイトカインの産生調節に関与する IL12 p 40 と interferon regulatory factor (IRF) -1 プロモーター領域の single nucleotide polymorphism (SNP) を検討してきた。今回は IL12 p 40 プロモーター領域の遺伝子多型について解析を行なうまでの研究戦略と、それらが BD の病態に及ぼす重要性について考察した。BD 患者 85 例、健常人 65 例を対象とし、末梢血有核細胞より抽出した genomic DNA を用いて解析したところ、BD 患者群と健常人群で有意差を認めた。引き続き、IL12 p 40 プロモーターのゲノタイプごとに、PBMC の LPS に対する反応性を検討する予定である。

- A. 背景： BD と IL-12 に関して、活動期の BD では Th1 型サイトカインである IFN γ 、IL12 の産生量が増加している報告や、病勢に応じて Th1 と Th2 のバランスが変化すると報告されている。BD の病態には種々の細胞性免疫機序が関与すると考えられており、特に Th1 型サイトカインの産生調節を行う IL12 が病態に深く関与していると思われる（図 1）。これまで我々は、IL12 p 40 untranslated region (UTR) の SNP 解析を行ない BD 群と健常人群で有意差を得なかつた¹。また、今までの報告では IL12 p 40 プロモーター領域に 4 bp 塩基の挿入がヘテロでみられると IL12 の産生量が低下するとの報告があり、喘息² や乾癬³ については解析が行なわれているものの、BD ではいまだ解析されていない。
- B. 研究目的： Th1 優位型の疾患で重要な役割を果たしている IL12 について BD 患者における遺伝子学的検討を行う事を目的として、これまでの報告をもとに IL-12 p40 プロモーター領域の多型解析（図 2）、を行った。
- C. 方法：BD 患者 85 名、正常人 65 名より

genomic DNA を抽出し IL12 p 40 プロモーター領域を PCR にて増幅した後、電気泳動にて 4 bp 挿入の有無を確認し（図 3）、これらの結果を、HLA-B51 の有無、病型で分別して統計学的に解析を行なった。

- D. 結果： BD 患者で 4 bp 挿入 homo:42(48.3%), hetero:45(51.7%), 健常人コントロールでは homo 42 (64.6%), hetero 23 (35.4%) で、さらに HLA-B51 の有無で分けてみると BDにおいては HLA-B51+ /homo:30 例、HLA-B51- /homo:12 例、HLA-B51+/hetero:19 例、HLA-B51- /hetero:26 例であり、これらの結果を Fisher's exact test で統計処理したところ、有意差を認めた（図 4）。また、病型による分類については有意差を認めなかつた。
- E. 考按： 今回は IL-12 p40 プロモーター領域において BD 群と健常人群で有意差を認めた。今後は BD 群と健常人群間のそれぞれの表現形における、末梢血単核球からの IL12 産生量の増減を検討する予定である。

F. 研究発表：ベーチェット病に関する調査
研究 平成 16 年度第 2 回研究会
(H15.11.26 福島)

G. 文献：

- 1) Yanagihori H, Tojo M, Inoue T, Nakamura K, Kaneko F, Nishida T, Mizuki N. Lack of association of interleukin-12 p40 gene (IL12B) polymorphism with Behcet's disease in the Japanese population. *J Dermatol Sci.* 2004 Apr; 34 (2):112-4.
- 2) Morahan G, Huang D, Wu M, Holt BJ, White GP, Kendall GE, Sly PD, Holt PG. Association of IL12B promoter polymorphism with severity of atopic and non-atopic asthma in children. *Lancet.* 2002 Aug 10;360 (9331):455-9.
- 3) Litjens NH, van der Plas MJ, Ravensbergen B, Numan-Ruberg SC, et al. Psoriasis is not associated with IL-12p70/IL-12p40 production and IL12B promoter polymorphism. *J Invest Dermatol.* 2004 Apr;122 (4):923-6.

図の説明

図 1.これまでに報告のあった BD と IL12 に関する報告

図 2.IL-12 p40 プロモーター領域多型領域についての説明

図 3.方法：PCR プライマー配列と電気泳動結果。ヘテロではバンドを 2 本認め、ホモ (++) では上方に 1 本、ホモ (--) では下方に 1 本のバンドを認める。

図 4.結果：BD 群と正常人群で有意差を認める。

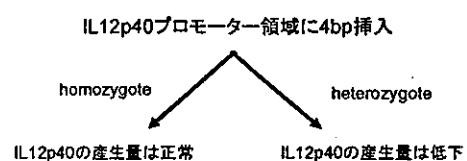
Behcet病におけるT細胞免疫異常(IL-12の関与) 図 1

*Th1 polarization of the immune response in Behcet disease
Frassonato MA et al. *J Rheumatol* (1999)

*Systemic levels of the T cell regulatory cytokines IL-10 and IL-12 in Behcet's disease ; soluble TNFR-75 as a biological marker of disease activity
Turar, B et al. *J Rheumatol* (1997)

*Divergent cytokine production profile in Behcet's disease.
Altered Th1/Th2 cell cytokine pattern
Raziuddin S et al. *J Rheumatol* (1998)

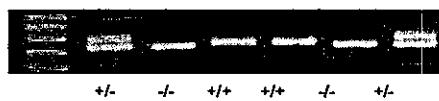
IL-12 p40 promoter領域についての報告 図 2



方 法 図 3

Behcet病患者群と正常人群からの末梢血からgenomic DNAを抽出しPCRで増幅した後、電気泳動にて4塩基の挿入があるか確認する。

sense primer
5'-TCAGACACATTAACCTTGCA-3'
anti-sense primer
5'-AGGTCTAATGTGGTCATTG-3'



IL12 promoter 結 果 図 4

4bp insertion	BD(n=87)			Control(n=65)		
	HLA-B51 +		Total	HLA-B51 +		Total
	homo	hetero		homo	hetero	
homo	30	12	42(48.3)	7	35	42(64.6)
hetero	19	26	45(51.7)	2	21	23(35.4)

p=0.045

4bp insertion	BD(n=87)		4bp insertion BD(n=87)		Control(n=65)	
	完全型		不完全型			
	homo	hetero	homo	hetero	homo	hetero
homo	22	20	++	12(13.8)	14(21.5)	
hetero	27	18	+-	45(51.7)	23(35.4)	
			--	30(34.5)	28(43.1)	

p>0.05 **p>0.05**

The numbers in parentheses indicate the percentage