

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 17 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 金子 史男

平成 18 年 (2006) 年 3 月

目 次

I 班員名簿	1
II 総括研究報告	
ベーチェッ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	
ゲノムワイドなマイクロサテライトマッピングによるベーチェット病の原因遺伝子の検索に関する研究	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)	
ベーチェット病とサイトカイン遺伝子多型の相関に関する研究	14
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)	
ベーチェット病における炎症に関与している細菌抗原に関する研究	17
分担研究者 小熊恵二 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病原細菌学)	
ベーチェット病における IL-12B プロモーター領域の多型解析と <i>Streptococcus Sanguinis</i> に対する反応性	20
分担研究者 金子史男 (福島県立医科大学医学部皮膚科学)	
ベーチェット病の病変局所における免疫異常及び炎症病態の解析	23
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)	
ベーチェット病症例における Toll-like receptor 9 遺伝子変異・多型の検索に関する研究	26
分担研究者 佐藤由紀夫 (福島県立医科大学医学部内科学第二講座)	
ベーチェット病患者末梢血における NKG2D 発現リンパ球の活性化レベルの検討	29
分担研究者 桑名正隆 (慶應義塾大学医学部内科)	
ベーチェット病の皮膚粘膜病変部における細胞障害性因子と浸潤細胞の検討	33
分担研究者 岩月啓氏 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚粘膜結合織学)	

ケモカイン受容体(CXCR3,CCR5)の実験的ぶどう膜炎における役割	36
分担研究者 川島秀俊 (さいたま赤十字病院眼科)	
ベーチェット病における白血球の異常に関する研究	42
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)	
TNF- α によるHO-1発現調節 一抗TNF抗体治療効果発現におけるHO-1の関与	45
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)	
口腔フローラのメタゲノム解析とバイオマーカーによる炎症評価に関する研究	49
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)	
ベーチェット病におけるシクロスポリンの治療効果と遺伝子多型性	52
分担研究者 太田正穂 (信州大学医学部法医学)	
ベーチェット病患者のシクロスポリン感受性に関する研究	56
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)	
難治性ベーチェット病にインフリキシマブを長期使用した1症例	58
分担研究者 川島秀俊 (さいたま赤十字病院眼科)	
抗炎症作用が知られていない既存薬剤のぶどう膜炎に対する有効性に関する研究	63
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)	
ラット experimental autoimmune uveoretinitis における human cationic antimicrobial protein18 の治療効果	65
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)	
NF- κ Bシグナル経路阻害によるラットエンドトキシン誘発ぶどう膜炎に対するアスタキサンチンの抑制効果	68
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)	
ベーチェット病動物モデルを用いた免疫制御療法の標的分子探索	71
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)	
ベーチェット病のH13-16年度臨床調査個人票電子化データの分析	78
分担研究者 稲葉 裕 (順天堂大学医学部衛生学)	

ベーチェット病患者の QOL 調査経過報告	82
分担研究者 稲葉 裕 (順天堂大学医学部衛生学)	
ベーチェット病患者の口腔関連 QOL に関する研究	87
研究協力者 内藤真理子 (名古屋大学大学院医学系研究科予防医学)	
IV研究成果の刊行に関する一覧表	91
V班会議プログラム	99

I. 班員名簿

ベーチェット病に関する調査研究班

区分	氏名	所属等	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	〃
	小野江 和則	北海道大学遺伝子病制御研究所病態研究部門免疫生物分野	教授
	鈴木 登	聖マリアンナ医科大学免疫学・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	講師
	桑名 正隆	慶應義塾大学医学部内科学	助教
	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	〃
	川島 秀俊	さいたま赤十字病院眼科	第二眼科部長
	小熊 恵二	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病原細菌学	教授
	岩月 啓氏	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚・粘膜・結合織学	〃
	佐藤 由紀夫	福島県立医科大学医学部内科学第二	〃
	中村 晃一郎	福島県立医科大学医学部皮膚科学	助教
	稲葉 裕	順天堂大学医学部衛生学	教授
太田 正穂	信州大学医学部法医学	講師	
研究協力者	内藤 真理子	名古屋大学大学院医学系研究科予防医学/医学推計・判断学分野	助手
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

ベーチェッ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 14～16 年度までに報告されたベーチェット病(BD と略す)の研究成果を踏まえて、さらに詳細な BD の病因・病態を解析し、新しい治療法の開発、疫学調査と QOL 調査を行った。

発症の内因子(責任感受性遺伝子)は、pooled DNA を用いて全ゲノムのマイクロサテライト (MS) マッピング法で得られた MS の PCR(polymerase chain reaction)分析から 2,183 個(9.3%)の陽性 MS が得られた。また、サイトカイン、ケモカインの遺伝子多型では 15 個の陽性 MS マーカーが得られた。抗原としての発症外因子は BD 患者の口腔内細菌叢において特異的に検出される *S.sanguinis* (113-20 株) (ATCC10056)に焦点を絞ると、それに対する IgA 抗体価が最も高く、本菌成分は BD 患者の Th 1 型反応に関与する樹状細胞(DC)に IL-12p40、p70 の発現を誘導するとともにそれらの産生がみられた。病変局所では *S.sanguinis* 由来 HSP(heat shock protein)-65、反応性のヒト由来 HSP-60 が検出され、HSP-60 陽性細胞には Th 1 型サイトカインの分泌がみられた。これらの細胞には自然免疫に関与する toll-like receptor (TLR)-2、4 の発現がみられ、CpG DNA に対する TLR-9 にも遺伝子多型が存在した。一方、BD 患者の病変部ならびに血中には CD8⁺T、NK、 γ δ T 細胞に NKG2D が高率に発現し、周辺組織では HSP-65/60 などによるストレスで MHC class I chain-related gene A (MICA)を発現し、それらの発現細胞が標的になる可能性が示された。これらの部位にはさらに炎症増強に関与する **granulysin** の発現がみられた。補体系の自然免疫に関しては、生体防御レクチンである **ficolin** の遺伝子 (FCN)系に **FCN2 promotor exon 8** の SNP 解析から遺伝子多型性がみられ、HLA-B51 遺伝子とも関与していた。一方、炎症部は TNF- α の発現を制御する抗炎症因子 **heme oxygenase (HO)-1** も発現され、複雑なサイトカインネットワークが形成されている。

口腔内の炎症は動物モデルにみられるように影響を受けた口腔内の状態から細菌フローラの変動がみられる。この状態は BD 患者にも同様の変化が起きている可能性が推定された。

治療に関して、眼症状出現時に用いられるシクロスポリン(CYA)に対する感受性については、代謝に関する遺伝子には多型性はみられず、むしろ **multi-drug resistance (MDR) -1** 遺伝子との関連が示唆された。新しい治療法の開発は、炎症部に生体反応として抑制的に出現する **human cationic antimicrobial protein (hCAP)-18**、HO-1 などの利用が検討された。

疫学および BD 患者の QOL に関する調査では、BD 患者の電子化入力データの分析から、男女比では女性にやや多く、重症型 BD では男性に多かった。BD 患者の QOL は国民標準値との比較で 8 つの尺度において全てが低く、特に日常役割機能(身体)と全体的健康感が低かった。口腔内の QOL 調査から BD 患者のアフタの出現は年間 12 \pm 28 個で、舌に多く、40 才以降出現が減少し、BD 患者は一般に口腔内の衛生状態が悪く、QOL が低いことが明らかになった。

A. 研究目的

平成 14~16 年度までに研究報告されたベーチェット病 (以下 BD と略す) に関する調査研究の成果をもとに、BD の病因・病態の解析、治療法ならびに予後に関する QOL (quality of life) と疫学調査とについて研究調査をすすめ、本疾患の病因の解明と治療法の確立を研究目的とした。

倫理面への配慮：研究推進に先立って、必要によってはそれぞれの施設における倫理委員会の了承を得た後、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注意し、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、同意を得た上で患者材料を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注意した。

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 患者の発症内因子としての HLA-B51 抗原の陽性頻度は民族を超えて 60% 前後であり、残り 40% 前後は HLA-B51 以外の HLA-B 抗原を有している。また、HLA-B51 の保有においても本症を発症するのはわずかであることから、本症には HLA-B51 対立遺伝子以外の遺伝子も関与する。疾患感受性遺伝子のスクリーニングとして全ゲノムの MS マッピング法を用いて全染色体をゲノムワイドにスクリーニングした。各個人の DNA を QIAamp DNA Blood Kit を使用し抽出して、100 サンプルを混合調整して pooled DNA を作製し、濃度を均一化した。pooled DNA は約 3 万個の MS マーカーについて PCR を行った。この一次スクリーニングにより得られたものを他の 100 人の pooled DNA で同様に二次スクリーニングし、更に三次スクリーニングにおいて全て陽性を示した MS マーカーについて individual DNA を用いて検討した。

この方法で、さらにインターロイキン(IL)及びケモカイン遺伝子多型についても言及した。

2. 発症外因子としての原因検索

平成 16 年度まで BD 患者の口腔内では健康人と異なる細菌叢が存在し、*Streptococcus(S.)* 113-20, 114-23, 118-1 株が特異的に検出されることをみてきた。また、その主な菌種は *S.oralis* と *S.sanguinis* であった。これらの菌の感染により、菌体からは分子量 65kDa の熱ショック蛋白 (heat shock protein:HSP) -65 が放出され、生体側からは HSP-60 が産生される。これら両者の塩基配列にはいくつかの相同ペプチドが存在しており、また反応する BD 患者の T 細胞エピトープの塩基配列のペプチド構造が明らかにされている。

- 1) 血清抗体については IgA 抗体に対応する細菌抗原分子について検討した。また、自然免疫との関連において HLA-B51 の役割と樹状細胞(DC)の IL-12p40 プロモーター領域の遺伝子多型解析と DC を介する *S.sanguinis* 成分との反応性については、LPS (lipo-polysaccharide) との比較において検討した。
- 2) 自然免疫過程における DC の HSP-65/60 に対する TLR (toll-like receptor)-2,4 の発現について検討するとともに、細菌由来性 CpG DNA peptide (CpG DNA) と TLR-9 の発現についての遺伝子多型を検討した。

3. BD 患者の免疫状態の検討

BD 患者の病変部は、いわゆる Th 1 型免疫反応が優勢であるが、多数の好中球浸潤を伴っている。その反応に関与するサイトカインの分泌とケモタクシスの発現によって、炎症が増強され複雑な反応が惹起されている。このことから、以下の点に焦点を当てて検討を行った。

- 1) 皮膚・粘膜病変部の浸潤細胞に関しては CD4⁺T、CD8⁺T、 $\gamma\delta$ T 細胞の発現する細胞傷害性活性シグナルの NKG2D とそのリガンドとして HLA-B51 近傍に存在する MICA (MHC class I chain-related gene A) が HSP-65/60 によるストレスで発現していると考えられ、モノクローナル抗体を用いてフローサイトメトリー法によって解析を行った。
- 2) 病変局所における細胞傷害性 T 細胞活性による炎症増強に granulysin の発現を共焦点レーザー顕微鏡で観察を行った。さらに

ケモカイン受容体(CXCR3, CCR5)の発現の有無については動物モデルで観察を行った。

- 3) BD 患者の自然免疫における補体活性化に関与する ficolin (FCN)の遺伝子多型を調べた。
- 4) TNF- α と抗炎症作用を示す heme oxygenase (HO)-1 との関連について RT-PCR 法および Western blotting でその発現を確認し、蛋白レベルを ELISA 法にて検討した。
- 5) イヌの動物モデルにおける口腔内炎症が与える口腔内細菌フローラに対する影響について検討した。

II. 治療法に関する検討

1. シクロスポリン(CYA)の感受性に関する遺伝子多型の検討

CYA の薬剤効果と血中濃度に関しては個人差がかなりあることから、感受性遺伝子が存在する恐れ、その多型性について検討した。実際の治療成績に関しては AUC (area under the curve) 0-4 の測定から有効群と無効群について治療効果を解析した。

2. BD 患者の活動期におけるキメラ型抗ヒト TNF- α 抗体療法の長期投与による効果について検討を行った。
3. 既存の抗炎症作用による実験的自己免疫性ぶどう膜炎(EAU)の治療効果の検討を行った。
4. Human cationic antimicrobial protein (hCAP)-18 による実験動物モデルへの投与による効果の検討を行った。
5. NF κ B シグナル経路阻害剤による治療の検討と免疫制御療法の検討を行った。

III. BD 患者の疫学と QOL 調査と口腔内症状の QOL 調査

1. 平成 13~16 年度の全国臨床調査個人票の電子化データからの分析を行った。QOL に関して、平成 15~16 年 3 月まで一次調査で回答のあった 1674 科の内 192 施設における調査を行った。QOL 調査票は SF-36V2 を用いて、国民標準値と比較し、重症度、年齢、薬剤投与後の症状について分析した。
2. 平成 16 年 11 月よりベーチェット病友の会および北海道ベーチェット病友の会会員に

郵送による質問票調査を行って、口腔内症状出現時における QOL の分析を行った。

C. 研究結果と考察

I. BD の病因・病態に関する結果と考察

1. 疾患感受性責任遺伝子とサイトカイン遺伝子多型

BD の発症に関する内因子としての疾患感受性遺伝子の分析は、HLA-B51 陽性を含む pooled DNA を用いて 22 本の常染色体と X、Y の性染色体に設定して得られた 23,465 個の MS マーカーのスクリーニングから、P 値 0.05 未満に入る遺伝子数は 2,183 個(9.3%)に陽性 MS をみた。さらに、これらの遺伝子から疾患感受性遺伝子が絞り込まれることによって、さらに絞り込まれた遺伝子が明らかにされるものと考えられる。また、サイトカイン、ケモカイン遺伝子の近傍 100kb 内の 119 個の MS マーカーについての PCR の結果は、P 値 0.05 未満では 12.6%、すなわち 15 個の MS マーカーが陽性を示した。特にインターロイキン(IL)遺伝子では 15.4%の 8 個の MS マーカーが陽性で、ケモカインでは 10.4% (7 個) の MS マーカーが陽性を示した。

2. 発症外因子としてのレンサ球菌抗原

- 1) これまでの研究成果から口腔内に存在する *S.oralis* (ATCC10057)、*S.sanguinis* (ATCC10056)、*S.salivarius* (ATCC7073)と *S.pyogenes* (WHO-T12)の蛋白成分に対する BD 患者の IgA 抗体の抗体価は *S.sanguinis* (113-2)株に対するものが最も高く、immunoblot 法から 30kDa~40kDa の抗原が検出される。この *S.sanguinis* 由来抗原と BD 患者の樹状細胞(DC)との反応は自然免疫を介する感作の可能性が考えられ、しかも、病変部における反応は Th 1 型サイトカインが重要な役割を演じている。このことから *S.sanguinis* と DC の IL-12 の分泌に関して IL-12p40 プロモーター領域における遺伝子多型の解析から、HLA-B51 とは関連なく BD 患者のヘテロ群で多型性があり、*S.sanguinis* 菌体蛋白に強い反応性を示し、BD 患者の PBMC (peripheral blood mononuclear cells)から IL-12p40、p70

産生を示した。

- 2) 皮膚病変部および腸管における反応においては、*S.sanguinis* 由来 HSP-65 および反応性のヒト HSP-60 はそれぞれ重要な役割を演じており、免疫組織学的検査から HSP-60 陽性細胞と浸潤細胞には IFN- γ 、CCR5、MIP-1 β 、IL-12、IL-12R、TNF- α 、TLR-2、TLR-4 が発現していた。一方、BD 患者には CpG DNA に対する反応から TLR-9 の遺伝子多型がみられ、病態に関与している可能性がある。
- 3) BD 患者の病変部ならびに末梢血中の活性細胞

活動期の BD 患者、非活動期の BD 患者と健常人の比較では、CD4⁺ T 細胞の NKG2D の発現には差はないが、CD8⁺T、NK、 γ δ T 細胞に NKG2D が高率に発現しており、活動期 BD 患者で高かった。これは HSP-65/60 の発現によるストレスなどで MICA を発現した細胞を標的に CD8⁺T、NK、 γ δ T 細胞が傷害を起こす機序を示している。これらの病変部にはさらに granulysin が発現し、炎症の増強が起きていることが推定される。さらに、動物モデルにみられるように CXCR3、CCR5 を介したケモカインによって Th 1 細胞の集積と反応の亢進が増強される。

自然免疫に関与する補体系反応では生体防御レクチンである ficolin の遺伝子 FCN-1、2 遺伝子の多型性を検討したところ、FCN-2 遺伝子の SNP 解析から allele 頻度で -557、-64 領域の両群間に有意差がみられ、ficolin 経路では HLA-B51 と関連していることも明らかであった。

このように、BD 患者の病変形成に関して、IFN- γ 、TNF- α 、IL-12 などのサイトカイン分泌による Th 1 型反応が進行している機序が明らかにされてきたが、一方ではその抑制反応、すなわち抗炎症作用を有する HO-1 も発現されており、TNF- α に対する産生抑制作用に関与していることが明らかになり、それを利用しての治療の可能性が示唆された。この HO-1 の発現は IL-4 および IL-10 の出現によって惹起されると推定された。

- 4) 口腔内炎症による細菌叢の変化
BD 患者の口腔内には健常人に存在する

ものと異なる *S.sanguinis* が増加しており、頻繁にアフタなどの炎症の出現を繰り返している。これらの口腔内の病的な状態を検討するために、口腔内炎症を繰り返す動物モデルとしてビーグル犬による口腔内細菌による DNA の変化について検討したところ、ストレス時に口腔内にヘキサノイルリジン(N ϵ -hexanoyl)Lysine (HEL) が出現し、細菌フローラにも変化がみられた。この現象は BD 患者にも同様に HEL が出現し、健常人に比べて有意に高値で、BD 患者は常に口腔内に炎症性ストレスを受けている可能性を示した。

II. 治療に関する研究結果と考察

1. CYA の感受性遺伝子多型について

CYA の吸収に関する個人差は、AUC 0-4 で C0、C1、C2、C3 との相関で検討するとトラフ値との相関係数は 0.666 で、AUC 0-4 とでは C2 と相関していた。実際の BD 患者の治療で CYA の有効性のみられた例では AUC 0-4 および C0~C4 値がそれぞれ相関していた。CYA の代謝に関する遺伝子 CYP3A4、CYP3A5 の多型性について検討したが、BD 患者の CYA 有効群と無効群とによる差はみられなかったため、これらは CYA の有効性に直接関与していない可能性があり、むしろ multi-drug resistance (MDR)-1 遺伝子との関連が示唆された。この MDR-1 遺伝子の変異は有効な CYA 血中濃度を知る AUC 0-4 値を反映している。

2. インフリキシマブ(T 剤)による BD 患者の長期治療について

T 剤はヒト TNF- α に対するキメラ型モノクローナル抗体である。既に、関節リウマチ、クローン病に対して使用され、BD 患者のぶどう膜炎治療にも短期的に使用されてきたが、長期治療例はない。25 才の男性 BD 患者(不全型)の眼発作再発例に T 剤 10mg/kg を 46 週投与した例では眼炎症がコントロールされ、副作用はなかったことから、T 剤は長期に使用できる薬剤と思われた。

3. 既存薬剤による治療の再検討

実験的自己免疫性網膜ぶどう膜炎(EAU)の C57/BL/6 マウスに対する胃粘膜保護剤(geranyl geranyl acetone;GGA)と高血圧心不

全治療剤(Losartan K)による加療による観察を行ったが、EAUの発症出現にLosartan Kは遅延を示したが、GGAの使用では眼球部にHSP-70が出現した。

4. 新しい治療法の開発

- 1) hCAP18、アスタキサンチン(AST)についてのラットのエンドキサン誘発ぶどう膜炎(EIU)に対する治療効果は、炎症部の活動性細胞のNF κ Bシグナル経路阻害によってプロスタグランジン(PG)E₂、NO合成を抑制してTNF- α 濃度を下げる可能性が示唆された。
- 2) マウスモデルEAUに対するオステオポンチン(osteopontin; OPN)の治療効果ではTh 1免疫偏倚をTh 2側に偏向させることによって、その効果発現が明らかになりつつあり、本現象によるBD患者への治療効果が期待される。

Ⅲ. BDの疫学と口腔関連QOL

1. 平成13～16年度全国のBD患者の電子入力データの成績は平成13年では3%、15年では50%に上昇してきているが、この方法ではまだ十分な解析はできない。平成15年度の分析では受給者数16,632件、入力数8,610件で、16年度の入力数8,424件の分析ではBD患者の男女比は0.88で女性に

やや多く、男性は眼症状を伴うstageⅡ～Ⅳが多く、また腸管型、神経型、血管型BDの順に男性患者が多いという成績が得られている。この入力データ数の上昇により、今後さらに詳細な分析結果が得られるものと期待できる。健康QOL尺度としてSF-36V2は身体機能、日常役割機能(身体)、体の痛み、全体的健康感、活力、社会的活機能、日常役割機能(精神)、心の健康の8尺度においては全体的に全て低く、特に皮膚粘膜症状有りの患者で低い結果となった。また、薬剤投与後の臨床症状で進行・無反応対象者のQOLは顕著に低かった。

2. BD患者のほぼ100%に口腔内症状が出現するが、これに関する口腔関連のQOLに関する調査はこれまでほとんど存在しない。このたび得られた883名(平均年齢56±14才)の調査からアフタの平均出現率は12±28回で、1回出現個数は2±2個で口腔内の出現部位は舌であり、40才以降減少の傾向にあった。口腔内の衛生状態は平成11年度の厚生労働省歯科疾患実態調査結果に比較して口腔内症状を有する割合がBD患者に高く、QOLに関してはSF-8検討から日本人の標準値より有意に低いことも明らかになった。

Ⅲ. 分担研究報告

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

ゲノムワイドなマイクロサテライトマッピングによる
ベーチェット病の原因遺伝子の検索に関する研究

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 教授
研究協力者 目黒 明¹⁾ 岡 晃²⁾ 勝山善彦³⁾ 太田正穂³⁾
竹本裕子⁴⁾ 南場研一⁴⁾ 大野重昭⁴⁾ 西田朋美⁵⁾
伊藤良樹¹⁾ 伊藤亜紀子¹⁾ 伊藤典彦¹⁾ 水木信久¹⁾

- 1) 横浜市立大学医学部眼科学
- 2) 東海大学医学部分子生命科学 2
- 3) 信州大学医学部法医学
- 4) 北海道大学大学院医学研究科視覚器病学
- 5) 聖隷横浜病院眼科

研究要旨 ベーチェット病は人種を超えて HLA-B51 抗原と相関することが知られているが、本病発症には HLA-B51 対立遺伝子以外に他の遺伝子も関与している可能性が示唆される。そこで私達は全ゲノムを網羅する多型性豊富なマイクロサテライト (MS) マーカーを用いて、ゲノムワイドに疾患遺伝子スクリーニングを行うことにより、HLA-B51 以外の本病感受性遺伝子の同定を試みた。現在までに 22 本の常染色体および X、Y 性染色体すべてにおいて一次スクリーニングを終了し、約 9.3% の陽性 MS マーカーが得られた。今後、二次および三次スクリーニングを行うことにより、疾患感受性遺伝子の候補領域をさらに絞り込んで行く予定である。

A. 研究目的

ベーチェット病は全身の諸臓器に急性の炎症を繰り返す原因不明の難治性疾患である。本病は内的遺伝因子の関与のもとに何らかの外的環境因子が働いて発症すると考えられている。内的遺伝因子として HLA-B51 抗原との顕著な相関が知られている。しかしながら、本病患者の HLA-B51 抗原陽性頻度はどの民族においても 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である。したがって、本病発症には HLA-B51 対立遺伝子以外に他の遺伝子も関与する可能性が示唆される。そこで我々は全ゲノムを網羅する多型性豊富なマイクロサテライトマーカー約 3 万個を用いて、ゲノムワイドに全染色体をスクリーニングすることにより、HLA-B51 対立遺伝子以外に他の本病感受性遺伝子を同定することを目的として研究を行っている。

B. 研究方法

疾患感受性遺伝子のスクリーニング法として全ゲノムを対象としたマイクロサテライトマッピング法を用いる。マイクロサテライト (MS) とはゲノム上に散在する数塩基 (2-5 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 (個人差) が存在することが知られている。すなわち、患者群と対照群で各マーカーにおけるアリル分布を比較することにより、疾患感受性遺伝子の存在する位置を正確にマッピングすることが可能である。既に我々は全ゲノムをカバーする多型性豊富な MS マーカー約 3 万個の収集を完了している。したがって、これらの MS マーカーを用いて、全染色体をゲノムワイドにスクリーニングする。

横浜市立大学附属病院眼科、北海道大学附属病院眼科またはゆあさ眼科等の医療機関にてベーチェット病と診断された本病患者およびベーチェット病友の会で本病として登録された患者を対象とし、文書による同意を得た後、末梢から 20ml を採血する。

QIAamp DNA Blood Maxi Kit を使用して DNA を抽出し、PicoGreen 定量キット (PicoGreen dsDNA Quantification Reagent and Kit 200-2000 assays) を用いて DNA 濃度を定量し、各個人の DNA 量が均一になるように 100 サンプルを混合・調整して pooled DNA を作成する。(正確なスクリーニングを行うため、患者群のサンプルは①完全型、②眼症状有りの不全型、③外陰部潰瘍有りの不全型の①～③の病型のサンプルのみを pooled DNA に用いる。) pooled DNA を鋳型として約 3 万個の MS マーカーについて PCR を行う。PCR 産物をキャピラリー式蛍光自動シークエンサー (ABI PRISM 3700 DNA Analyzer) で電気泳動し、波形解析後、MS のアレル分布を決定する。マーカー毎に患者群と健常群のアレル分布を統計学的に解析し、疾患遺伝子と相関する陽性マーカーを決定する(一次スクリーニング)。

一次スクリーニングにより得られた陽性マーカーに関して異なる別の 100 人の患者集団の pooled DNA を用いて、同様の解析(二次スクリーニング)を行う。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。

(倫理面への配慮)

全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他に漏洩しないように厳重に管理されている。

C. 研究結果

ベーチェット病の原因遺伝子の強さ (λ_s) から判断し、本病の疾患感受性遺伝子スクリーニングに必要な患者数は 500 人程度と推察され、それを目標としている。現在までに総計 410 の患者サンプルを収集した(表 1)。その内、310 サンプルで病型の確認が終了し、299 サンプルが 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、299 サンプルの情報を反映するように 100 サンプルを選択し、一次スクリーニング用 pooled DNA を作成した。100 サンプルの内訳は、男性 57 人、女性 43 人、平均発症年齢 33.9 歳、病型で分類すると完全型 46 人、不全型 54 人であった。また B51 陽性者は 56 人であった。対照群は患者群と性比を合わせた健常者 100 人を用いた。対照群の B51 陽性者は 15 人であった(表 2)。これら両群の pooled DNA を用い、22 本の常染色体および X、Y の性染色体に設定した 23465 個すべての MS マーカーについて 1 次スクリーニングを行った。その結果、約 99.6% の 23362 個の MS マーカーの波形解析を完了し、約 9.3% の 2183 個の MS マーカーが P 値 0.05 未満の陽性を示した(表 3)。

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) 毎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 ($3.1\text{GB} \div 100\text{kb} = 3.1$ 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、すべて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 9.3% であった。この中には偽陽性のマーカーがかなり多く含まれていると考えられる。現在、得られた陽性マーカーから偽陽性の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(表 2)を用いて pooled DNA を作成し、一次スクリーニングで陽性を示した 2183 個のマーカーに対して二次スクリーニングを行っているところである。今後、二次スクリーニングが終了次第、別の患者集団 100 人を用いて pooled DNA を作成し、三次スクリーニングを行い、陽性マーカーを絞り込む予定

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、22本の常染色体およびX、Yの性染色体で一次MSスクリーニングが終了し、陽性率は約9.3%であった。今後、二次スクリーニングおよび三次スクリーニングを進め、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17年度)

- 1) Katoh T, Mano S, Munkhbat B, Tounai K, Oyungerel G, Chae GT, Han H, Jia GJ, Tokunaga K, Munkhtuvshin N, Tamiya G, Inoko H: Genetic features of Khoton Mongolians revealed by SNP analysis of the X chromosome. *Gene*. 357:95-102, 2005.
- 2) Shichi D, Kikkawa EF, Ota M, Katsuyama Y, Kimura A, Matsumori A, Kulski JK, Naruse TK, Inoko H: The haplotype block, NFKBIL1-ATP6V1G2-BAT1-MICB-MICA, within the class III - class I boundary region of the human major histocompatibility complex may control susceptibility to hepatitis C virus-associated dilated cardiomyopathy. *Tissue Antigens*. 66: 200-208, 2005.
- 3) Kulski JK, Anzai T, Inoko H: ERVK9, transposons and the evolution of MHC class I duplicons within the alpha-block of the human and chimpanzee. *Cytogenetic and Genome Research*. 110: 181-192, 2005.
- 4) Tamiya G, Shinya M, Imanish T, Ikuta T, Makino S, Okamoto K, Furugaki K, Matsumoto T, Mano S, Ando S, Nozaki Y, Yukawa W, Nakashige R, Yamaguchi D, Ishibashi H, Yonekura M, Nakami Y, Takayama S, Endo T, Saruwatari T, Yagura M, Yoshikawa Y, Fujimoto K, Oka A, Chiku S, Linsen SEV, Giphart MJ, Kulski JK, Fukazawa T, Hashimoto H, M Kimura, Hoshina Y, Suzuki Y, Hotta T, Mochida J, Minezaki T, Komai K, Shiozawa S, Taniguchi A, Yamanaka H, Kamatani N, Gojobori T, Bahram S, Inoko H: Whole genome association study of rheumatoid arthritis using 27,039 microsatellites. *Hum Mol Genetics*. 14: 2305-2321, 2005.
- 5) Fukami-Kobayashi K, Shiina T, Anzai T, Sano K, Yamazaki M, Inoko H, Tateno Y: Genomic evolution of MHC class I region in primates. *Proc Nat Acad Sci USA*. 102: 9230-923, 2005.
- 6) Kikkawa EF, Tsuda TT, Naruse TK, Sumiyama D, Fukuda M, Kurita M, Murata K, Wilson RP, Lemaho Y, Tsuda M, Kulski JK, Inoko H: Analysis of the sequence variations in the Mhc DRB1-like gene of the endangered Humboldt penguin (*Spheniscus humboldti*). *Immunogenetics*. 57: 99-107, 2005.
- 7) Suzuki K, Tanaka H, Sahara H, Tanaka N, Tamura Y, Naruse T, Inoko H, Tsushima K, Kubo K, Abe S, Sato N: HLA class II DPB1, DQA1, DQB1, and DRB1 genotypic associations with occupational allergic cough to Bunashimeji mushroom. *Tissue Antigens*. 65: 459-466, 2005.
- 8) Katoh T, Munkhbat B, Tounai K, Mano S, Ando H, Oyungerel G, Chae GT, Han H, Jia GJ, Tokunaga K, Munkhtuvshin N, Tamiya G, Inoko H: Genetic features of Mongolian ethnic groups revealed by Y-chromosomal analysis. *Gene*. 346: 63-70, 2005.
- 9) Shiina T, Dijkstra JM, Shimizu S, Watanabe A, Yanagiya K, Kiryu I, Fujiwara A, Nishida-Umehara C, Kaba Y, Hirono I, Yoshiura Y, Aoki T, Inoko H, Kulski JK, Ototake M: Interchromosomal duplication of major histocompatibility complex class I regions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), a species with a presumably recent tetraploid ancestry. *Immunogenetics*. 56: 878-893, 2005.
- 10) Ando A, Ota M, Sada M, Katsuyama Y, Goto R, Shigenari A, Kawata H, Anzai T, Iwanaga T, Miyoshi Y, Fujimura N, Inoko H: Rapid assignment of the swine major histocompatibility complex (SLA) class I and II genotypes in Clawn miniature swine using PCR-SSP and

- PCR-RFLP methods.
Xenotransplantation. 12: 121-126, 2005.
- 11) Matsuzaka Y, Okamoto K, Mabuchi T, Iizuka M, Ozawa A, Oka A, Tamiya G, Kulski JK, Inoko H: Identification and characterization of novel variants of the thioredoxin reductase 3 new transcript 1TXNRD3NT1. Mamm Genome. 16: 41-49, 2005.
 - 12) Itoh Y, Mizuki N, Shimada T, Azuma F, Itakura M, Kashiwase K, Kikkawa E, Kulski JK, Satake M, Inoko H: High-throughput DNA typing of HLA-A, -B, -C, and -DRB1 loci by a PCR-SSOP-Luminex method in the Japanese population. Immunogenetics. 57: 1-13, 2005.
 - 13) Bahram S, Inoko H, Shiina T, Radosavljevic M: MIC and other NKG2D ligands: from none to too many. Curr Opin Immunol. 17: 505-509, 2005.
 - 14) Kimura T, Yoshida K, Shimada A, Jindo T, Sakaizumi M, Mitani H, Naruse K, Takeda H, Inoko H, Tamiya G, Shinya M. Genetic linkage map of medaka with polymerase chain reaction length polymorphisms. Gene. 363: 24-31, 2005.
 - 15) Ogawa Y, Kodama H, Kameyama K, Yamazaki K, Yasuoka H, Okamoto S, Inoko H, Kawakami Y, Kuwana M: Donor fibroblast chimerism in the pathogenic fibrotic lesion of human chronic graft-versus-Host disease. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 46: 4519-4527, 2005.
 - 16) Kulski JK, Kenworthy W, Bellgard M, Taplin R, Okamoto K, Oka A, Mabuchi T, Ozawa A, Tamiya G, Inoko H: Gene expression profiling of Japanese psoriatic skin reveals an increased activity in molecular stress and immune response signals. J Mol Med 83: 964-975, 2005.
 - 17) Ogawa Y, Kodama H, Kameyama K, Yamazaki K, Yasuoka H, Okamoto S, Inoko H, Kawakami Y, Kuwana. Donor fibroblast chimerism in the pathogenic fibrotic lesion of human chronic graft-versus-host disease. Invest Ophthalmol Vis Sci. 46: 4519-4527, 2005.
 - 18) Mizutani A, Ostuka M, Kimira M, Tanaka M, Inoko H: An EYFP insertion mutant containing a modified lox sequence for potential use as a recombination indicator. Nucleic Acid Symposium Series. 49: 297-298, 2005.
 - 19) Ando A, Shigenari A, Kulski JK, Renard C, Chardon P, Shiina T, Inoko H. Genomic sequence analysis of the 238-kb swine segment with a cluster of TRIM and olfactory receptor genes located, but with no class I genes, at the distal end of the SLA class I region. Immunogenetics in press.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許申請

名称: 高血圧症の検査用マーカー遺伝子

発明者: 猪子英俊、水木信久、岡晃、梅村敏、三木哲郎

出願日: 2005年9月14日

出願人: 東海大学、横浜市立大学、愛媛大学

国内出願番号: 2005-267657

表1. サンプル収集状況

横浜市立大学	110	北海道大学	77
久留米大学	1	ゆあさ眼科	39
藤岡眼科	2	ペーチェット病友の会	183
			総計 410

表2. pooled DNA検体情報

	1st 100検体		2nd 100検体	
	疾患群	健常群	疾患群	健常群
男/女	57/43	57/43	58/42	58/42
平均発症年齢	33.9歳		35.1歳	
完全型/不全型	46/54		45/55	
主症状				
口腔内アフタ	100		97	
皮膚症状	87		87	
眼症状	89		88	
外陰部潰瘍	61		61	
副症状				
関節炎	42		37	
副睾丸炎	5		8	
消化器症状	16		10	
血管病変	1		4	
中枢神経病変	8		9	
HLA-B51陽性	56	15	55	15

表3. 1次スクリーニング結果

染色体	実験マーカー数	解析マーカー数	陽性マーカー数	陽性率
chr.01	1895	1884	223	11.8%
chr.02	2053	2043	177	8.7%
chr.03	1650	1637	151	9.2%
chr.04	1554	1549	140	9.0%
chr.05	1500	1496	124	8.3%
chr.06	1369	1364	144	10.6%
chr.07	1370	1366	127	9.3%
chr.08	1103	1102	111	10.1%
chr.09	956	953	75	7.9%
chr.10	1097	1095	110	10.0%
chr.11	1076	1070	75	7.0%
chr.12	1128	1121	112	10.0%
chr.13	806	803	69	8.6%
chr.14	709	707	62	8.8%
chr.15	610	607	57	9.4%
chr.16	631	629	64	10.2%
chr.17	626	621	75	12.1%
chr.18	649	648	57	8.8%
chr.19	454	449	69	15.4%
chr.20	501	498	52	10.4%
chr.21	296	295	26	8.8%
chr.22	251	251	34	13.5%
chr.X	1105	1101	48	4.4%
chr.Y	76	73	1	1.4%
total	23465	23362	2183	9.3%

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

ベーチェット病とサイトカイン遺伝子多型の相関に関する研究

分担研究者 水木信久 横浜市立大学医学部眼科学教室 教授

研究協力者 目黒 明¹⁾ 伊藤良樹¹⁾ 伊藤亜紀子¹⁾ 伊藤典彦¹⁾

西田朋美²⁾ 勝山善彦³⁾ 太田正穂³⁾ 竹本裕子⁴⁾

南場研一⁴⁾ 大野重昭⁴⁾ 岡 晃⁵⁾ 猪子英俊⁵⁾

1) 横浜市立大学医学部眼科学 2) 聖隷横浜病院眼科

3) 信州大学医学部法医学 4) 北海道大学大学院医学研究科視覚器病学

5) 東海大学医学部分子生命科学2

研究要旨 ベーチェット病は全身の諸臓器に急性の炎症を繰り返す難治性炎症性疾患であり、その発症には何らかの免疫異常が関与することが示唆されている。また、本病は自己免疫疾患である可能性も示唆されており、本病発症にサイトカインが関与していることが考えられる。そこで私達はインターロイキンおよびケモカイン遺伝子の近傍に位置する 119 個のマイクロサテライト (MS) マーカーを用いて、本病と相関するサイトカイン遺伝子の同定を試みた。現在までに pooled DNA (100 人の混合 DNA) を用いたスクリーニングを終了し、約 12.6% の 15 個の陽性 MS マーカーが得られた。今後、individual DNA スクリーニングによる陽性マーカーの絞り込みを行い、その絞り込まれた領域内の SNP 解析により、本病発症に関与するサイトカイン遺伝子およびその遺伝子変異を同定していきたい。

A. 研究目的

ベーチェット病は全身の諸臓器に急性の炎症を繰り返す原因不明の難治性炎症性疾患である。本病発症には何らかの免疫異常が関与することが示唆されており、免疫システムの恒常性維持に密接に関係するサイトカインシグナルの伝達機構の異常が本病発症に大きく関与している可能性が考えられる。そこで私達はサイトカイン遺伝子の近傍に位置するマイクロサテライトマーカーを用いて本病と相関するサイトカイン遺伝子について検討した。

B. 研究方法

サイトカイン遺伝子のスクリーニング法にはマイクロサテライトマーカーを用いる。マイクロサテライト (MS) とはゲノム上に散在する数塩基 (2-5 塩基) 単位の反復配列のことで、その反復回数には多型性 (個人差) があり、疾患遺伝子マッピングの有用な遺伝子マーカーとなり得る。本研究ではサイトカイン遺伝子の近傍 100kb (MS の連鎖不

平衡の距離) 内に存在する MS マーカーにおけるアレル分布を患者群と健常群で比較することにより解析を行う。今回はインターロイキンおよびケモカイン遺伝子近傍の MS マーカーを対象とした。

本病患者 100 人と健常者 100 人の血液から DNA を抽出し、DNA 濃度の定量を行う。両群ともに各個人の DNA 量が均一になるように 100 サンプル分を混合・調整して pooled DNA を作成する。pooled DNA を鋳型としてインターロイキンおよびケモカイン遺伝子の近傍 100kb 内に存在する 119 個の MS マーカーについて PCR を行う。PCR 産物を自動 DNA シークエンサー (ABI PRISM 3700 DNA Analyzer) で電気泳動し、波形を解析後、MS のアレル分布を決定する。マーカー毎に患者群と健常群のアレル分布を統計学的に解析し、陽性マーカーを決定する。統計学的検定は Fisher の直接法による P 値検定を行い、P 値が 0.05 未満を示すマーカーを陽性 MS マーカーとする。

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、100 サンプル個々の DNA (individual DNA) を用いた PCR を行い、疾患遺伝子と相関する真の MS マーカーを同定する。

(倫理面への配慮)

本研究は横浜市立大学倫理委員会にて審査され、承認されたものである。対象患者には研究の目的、研究の期間と方法、予測される効果及び危険性、協力しない場合であっても不利益を受けないこと、研究への参加に同意した場合であっても、随時これを撤回できること等を十分説明し、インフォームドコンセントを得た上で研究に参加して戴いた。得られた個人情報には連結匿名化の上、本研究に関わらない個人情報管理者により厳重に管理されている。

C. 研究結果

インターロイキンおよびケモカイン遺伝子近傍の総計 119 個の MS マーカーについて pooled DNA スクリーニングが終了し、P 値 0.05 未満で判定して約 12.6% の 15 個の MS マーカーが陽性を示した。

インターロイキン (IL) 遺伝子近傍に存在する 52 個の MS マーカーでは約 15.4% の 8 個の MS マーカーが陽性を示した。連鎖不平衡を示す物理的距離 100kb 内に陽性マーカーが存在する遺伝子は IL-1、IL-5、IL-8、IL-13、IL-15、IL-17C、IL-28A、IL-28B、IL-29、IL-32 の 10 個の遺伝子であった (表 1)。

CC 型および CXC 型ケモカインのリガンドとレセプター遺伝子近傍の 67 個の MS マーカーでは約 10.4% の 7 個の MS マーカーが陽性であった。これら陽性マーカーから 100kb 内に位置する遺伝子は CC 型では CCL5、CCL25 の 2 個のリガンド遺伝子と CCR1、CCR3、CCR4、CCR5 の 4 個のレセプター遺伝子の計 6 遺伝子であり (表 2)、CXC 型では CXCL8(IL-8)、CXCL12 の 2 個のリガンド遺伝子と CX3CR1 の 1 個のレセプター遺伝子の計 3 遺伝子であった (表 3)。

D. 考察

今回、インターロイキンおよびケモカイン遺伝子近傍の 119 個の MS マーカーについ

て pooled DNA スクリーニングを行い、約 12.6% の 15 個の MS マーカーが P 値 0.05 未満の陽性を示した。インターロイキン群とケモカイン群で陽性率を分けるとそれぞれ 15.4% と 10.4% であり、本研究と同時に遂行している全染色体を対象とした MS マッピング (23465 個の MS マーカー) の pooled DNA スクリーニングの陽性率 9.3% に比して、インターロイキンの遺伝子近傍では高い頻度で陽性マーカーが見られた。しかしながら、この中には偽陽性のマーカーが含まれていると考えられるため、今後 individual DNA スクリーニングを行い、偽陽性のマーカーを除外する必要がある。

E. 結論

インターロイキンおよびケモカイン遺伝子近傍の MS マーカーについて pooled DNA スクリーニングが終了し、15 個 (11.7%) の陽性マーカーを認めた。今後、individual DNA スクリーニングにより候補領域を絞り込み、次にその絞り込まれた領域内で SNP 解析を行い、本病発症に関与するサイトカイン遺伝子およびその遺伝子変異を同定していきたい。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表 (平成 17 年度)

特記事項なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許申請

名称: 高血圧症の検査用マーカー遺伝子

出願番号: 特願 2005-267657

出願日: 2005/9/14

出願人: 公立大学法人横浜市立大学

発明者: 梅村 敏, 水木 信久, 谷津 圭介, 猪子 英俊, 岡 晃