

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18年度 総括・分担研究報告書

平成19年(2007)年3月

主任研究者 金子史男

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	
疾患感受性遺伝子 (発症内因子)	
ゲノムワイドなマイクロサテライトによる相関解析を用いたベーチェット病の 感受性遺伝子の検索に関する研究.....	9
猪子 英俊 (東海大学医学部分子生命科学系遺伝情報部門)	
PCR-Luminex 法を用いた日本人ベーチェット病患者における 症状別 HLA 遺伝子解析に関する研究	15
水木 信久 (横浜市立大学大学院医学研究科視覚器病態学)	
病因病態と発症外因子	
ベーチェット病の病態における末梢血 NK 細胞の機能解析.....	21
桑名 正隆 (慶應義塾大学医学部内科)	
ベーチェット病におけるフィコリン血中濃度に関する研究.....	27
中村晃一郎 (福島県立医科大学医学部皮膚科学)	
ベーチェット病における S100A8/9 蛋白の炎症バイオマーカーとしての意義	31
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)	
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に関する研究.....	35
鈴木 登 (聖マリアンナ医科大学免疫学・病害動物学)	
ベーチェット病の細菌抗原に対する免疫反応に関する研究.....	41
小熊 恵二 (岡山大学大学院医歯学総合研究科病原細菌学)	
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	45
小林 浩子 (福島県立医科大学医学部内科学第二講座)	
ベーチェット病における HO-1発現低下と TLR 発現異常.....	47
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)	
抗菌ペプチドの問題点とその克服および抗菌ステロイドへのシフトについて.....	51
磯貝恵美子 (北海道医療大学歯学部口腔衛生学)	

実験動物モデルと眼病変	
CXCR3, CCR5ダブルノックアウトマウスによる実験的ぶどう膜炎とその検討	57
川島 秀俊 (さいたま赤十字病院眼科)	
ベーチェット病の長期観察例における眼発作頻度の経過に関する研究	65
川島 秀俊 (さいたま赤十字病院眼科)	
治療と新しい治療法の開発	
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	71
太田 正穂 (信州大学医学部法医学)	
ベーチェット病の内眼炎に対する抗 TNF- α 抗体治療に関する研究	75
大野 重昭 (北海道大学大学院医学研究科視覚器病学)	
生物学的製剤使用時における結核の免疫学的診断法	79
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)	
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	83
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)	
ベーチェット病特殊型の診断と治療ガイドライン作成に向けて	
腸管ベーチェット病の診断ガイドライン作成に向けて	89
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)	
疫学と QOL	
ベーチェット病患者の口腔保健と QOL に関する研究	93
内藤真理子 (名古屋大学大学院医学系研究科予防医学)	
臨床調査個人票を用いたベーチェット病の予後の検討	97
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 調査ベースラインデータ分析結果と Follow up 調査経過報告	101
稲葉 裕 (順天堂大学医学部衛生学)	
ベーチェット病眼病変の国際疫学に関する研究	107
大野 重昭 (北海道大学大学院医学研究科視覚器病学)	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	109
V. 班会議プログラム	121

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	名 誉 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
	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	〃
	猪 子 英 俊	東海大学医学部分子生命科学系遺伝情報部門	〃
	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 授
	鈴 木 登	聖マリアンナ医科大学免疫学・病害動物学	教 授
	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	〃
	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	〃
	中 村 晃一郎	福島県立医科大学医学部皮膚科学	助 教 授
	小 林 浩 子	福島県立医科大学医学部内科学第二	助 手
	稲 葉 裕	順天堂大学医学部衛生学	教 授
	太 田 正 徳	信州大学医学部法医学	講 師
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	柳 堀 浩 克	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	助 手
経理事務 担当者	武 藤 節 雄	福島県立医科大学事務局企画グループ 〒960-1295福島県福島市光が丘1番地 TEL (024) 547-1825 FAX (024) 547-1991 E-mail:rs@fmu.ac.jp	

II. 總括研究報告

総括研究報告書

主任研究者 金子史男（福島県立医科大学名誉教授）

研究要旨

本総括は平成17-19年度の研究期間の中間報告であるが、これまでの研究の流れと今後の展望を踏まえて「既に公表した研究成果」、「研究継続とその成果」、「ベーチェット病の疫学」と「次年度への研究の展望」として本研究をまとめてみた。

疾患の概念

ベーチェット病（BD）は1937年トルコの H. Behcet によって提唱された多臓器侵襲性の難治性の疾患である。口腔粘膜のアフタ性潰瘍、皮膚症状（毛囊炎様皮疹、結節性紅斑様皮疹、など）、内眼炎（網膜ぶどう膜炎）、外陰部潰瘍を主症状とし、副症状として関節炎、副睾丸炎などを伴う急性炎症性発作を繰り返すことを特徴とする。本症は、失明率が高いこと、20歳代後半から40歳代にかけての働き盛りの発病が多いこと、腸管型、血管型、神経型などの特殊型 BD の死亡が少なからず見られる慢性難治性疾患で、社会的にも問題が大きい。

本邦では1974年（昭和49年）より難治性疾患として認定され、当時の厚生省における支援の下にその病因・病態・治療に関する研究と疫学調査が開始され、現在まで行われてきた。BD の診断基準に関しては、1974年に初期の診断基準が提唱され、これまでに数回改定を重ね、1987年（昭和62年）に現在の診断基準の基本が出来上がった。2003年（平成15年）には、主な新しい知見、活動期、重症度分類などが追加され、現在に至っている。

I. 既に公表した研究成果のまとめ

1. BD の病因・病態に関する研究成果

1) 発症内因子について

遺伝的背景に HLA-B51 (HLA-B*510101) を有する患者が世界の民族を問わず60%以上を占め、発症機序のひとつとして HLA-B51 に連鎖する遺

伝素因の役割が重視されている。実際、HLA-B51 保有者では、BD に罹患する相対危険率も17.1と極めて高く、一般に HLA-B51 を有する BD 患者では重症型になることが多い。実験動物における HLA-B51 トランスジェニックマウスでは好中球の活性が高く、ヒトでは HLA-B51 陽性患者の好中球は、生体内で既にプライミングされ、活性化準備状態にあることが明らかにされており、HLA-B51 遺伝子は好中球の機能制御に関与していることが分かった。このようなことから、BD の発症内因子として考えられ、HLA-B51 陰性の患者においてもその疾患感受性遺伝子が HLA-B51 の近傍に存在している可能性がある。また、同じ第6染色体短腕上に位置する major histocompatibility (MHC) class I-related gene A (MICA) (特に細胞膜貫通性アラニン残基を6有し、A6遺伝子多型を有する MICA*009) も重要な遺伝的発症機構のひとつであることが明らかにされてきた。

2) 発症外因子について

BD 患者の口腔内に特異的に *Streptococcus* (*S.*) *sanguinis* (KTH 1 type) (旧分類, *S. sanguis*) が増殖していることが指摘され、この *S. sanguinis* を含むレンサ球菌群に対して BD 患者では過敏反応を示す。さらに、*S. sanguinis* から cloning して得られた、Bes-1 DNA は眼網膜蛋白ペプチド (Brn-3b) との間に相同塩基配列を有するペプチドが存在する。この Bes-1 DNA は BD 患者の皮膚・粘膜病変部に PCR (polymerase chain reaction) で検出され、浸潤細胞核内に存在することが in situ PCR hybridization で確認された。このことから *S. sanguinis* が BD の病因と重要な関係にあること

が想定された。さらに、*S. sanguinis* 由来の分子量65kDaの熱ショック蛋白 (heat shock protein) (HSP-65) の存在が皮膚ならびに腸管病変部に免疫組織学的に確認され、その免疫応答として反応性に自己のヒト HSP-60が出現していることも確認された。また、この反応性に出現するヒト HSP-60に対しても BD 患者の Tリンパ球は特異的に反応を示し、前炎症性サイトカイン及び好中球指向性サイトカインを活発に産生する。本来、自己のヒト HSP-60は組織障害物の salvage の役割をはたすが、BD 患者ではこれに対する抗 HSP 自己抗体が出現していることから病変部に影響を与え、自己免疫性反応を示していることが推定されている。

一方、HSP-65/60の両者の相同性ペプチドは T細胞エピトープと反応し、その反応部の塩基構造も明らかにされた。英国 Lehner らの研究グループは HSP-65/60の相同部のアミノ酸のペプチド (p336-351) は BD 患者の T細胞エピトープと結合すると T細胞の抑制作用を示すことから、このペプチドと cholera toxin subunit B との結合製剤を作成し、治療へ応用して患者の進行性ぶどう膜炎を抑制したと報告している。

3) BD 病変部の病態について

病変部では、Tリンパ球、特に CD8⁺ T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞などの細胞傷害性細胞の浸潤により interferon (IFN)- γ 、tumor necrosis factor (TNF)- α などの Th1型サイトカインの分泌を介し、また好中球やマクロファージの異常活性化による組織傷害が加わり、Th1型反応による炎症病態が形成されるという証拠が集積しつつある。

しかしながら、「免疫遺伝学的背景である HLA-B51との関連をどのように考えたらよいのであろうか？」の疑問が長らくあったが、その疑問に対する答えが徐々に明らかになりつつある。すなわち、活動期 BD の病変部にはストレス誘導性 MICA*009遺伝子が発現され、その細胞は HLA-B51発現細胞傷害性 Tリンパ球により傷害を受けるという成績が得られた。このことは、活動期 BD 患者の病変部出現は MICA の発現と HLA-B51が重要な役目を演じていることを示している。

4) 細胞傷害性細胞と BD 病変

Granulysin, granzyme B, perforin などは T細胞、natural killer (NK) 細胞より放出される蛋白である。これらの蛋白は、本来進入した病原体などに対する強力な抗菌活性を示すとされているが、他方これらの存在を検出することにより、細胞傷害性 T細胞の活性を示す指標とされる。このことから、granulysin を取り上げて BD 患者の病変部組織についてその存在について免疫組織学的検討を行ったところ、浸潤した CD4⁺ CD8⁺ T細胞に表現されていることが判明した。

5) BD の発症内因子と外因子との関係

Th1型免疫反応に関与する interleukin (IL) -12 の IL-12p40プロモーター領域について遺伝子多型をみるために、BD 患者の HLA-B51陽性群と陰性群の末梢血単核球 (PBMC) から genomic DNA を抽出して、4bp 塩基の挿入によって homo 接合子および hetero 接合子の群に分けて遺伝子多型を見た。その結果、HLA-B51陽性 BD 患者では健常人との有意差はないが、HLA-B51陰性の BD 患者の DNA の hetero 接合体を有する患者に IL-12p40, p70産生能に有意差があり、多型性が見られた。また、同時に BD 発症外因子としての *S. sanguinis* 抗原の刺激において、hetero 接合体を有する BD 患者の PBMC は RT-PCR 法にて IL-12p40mRNA の発現が顕著であった。

6) 自然免疫機序の関与

口腔内に存在する細菌抗原の感作に関しては、主として自然免疫による感作機序の関与が推定される。すなわち、BD 患者の腸管病変においては免疫組織学的に抗原情報伝達細胞としての樹状細胞、単核細胞には toll-like receptor (TLR) -2, 4表現細胞が浸潤していることが証明されている。他方、CpG DNA により BD 患者の PBMC は刺激されるところから、TLR9の発現も想定された。

2. 治療に関する研究成果

1) ステロイドによる治療

BD 患者の治療においてステロイドの全身投与については賛否両論あり、当初の研究成果ではステロイドによる眼症状の誘発が主張された。しかしながら、急性期の発作性眼症状の BD 患者、神経症状、大血管炎を併発した患者などにはステロ

イドを使用せざるを得ない。そのことから、眼症状とステロイドの関係について検討が行われたが、特にステロイド投与の急激な停止などの方法を避けることにより、眼症状は誘発されないことが明らかにされ、眼科領域においては、眼内埋め込みのよるステロイドの除放療法が行われており、その効果が報告されている。

2) シクロスポリン (CYA) による効果

BD 患者の治療に CYA は重要な役目を演じてきたが、患者の中には CYA に対して効果なく、その治療期間中に神経炎を招来し、神経型 BD と誤診される症例が報告された。また、CYA の治療を期待したにもかかわらず、感受性のない患者もいることが判明してきた。このことから、BD 患者のリンパ球に CYA 感受性遺伝子の発現のプロモーター領域の遺伝子多型性を検討する必要性が出てきた。

3) 生物製剤、特に抗サイトカイン抗体による治療

活動期の BD 患者の血清、病変部組織には IL-1 α , IL-6, IL-8, TNF- α , INF- γ などが検出される。このようなことから、活動期の局所の炎症抑制のため、抗 IL-6 抗体、抗 TNF- α 抗体による治療が試行されたところいずれも有効であることが判明し、特に後者のヒトキメラ型 TNF α 抗体製剤 (インフリキシマブ) による治療が開始され、有効の結果が得られた。

4) 生体に存在する抗菌因子、抗炎症性因子の治療薬としての可能性の検討

生体に進入した異物に対する抗菌物質、カセリジンファミリーに属する cationic antimicrobial protein 18 (CAP18/LI37), heme oxygenase (HO)-1 は夫々、抗菌作用、抗炎症作用を有することから、これらの活用の可能性について検討した。

5) その他の治療薬としての可能性の追求

実験的自己免疫性ぶどう膜炎 (experimental autoimmune uveitis) (EAU) を誘導したマウスに NF- κ 阻害剤、アスタキサンチン、免疫偏奇させるオステオポンチンの効果などが検討された。

II. 研究継続とその成果

1. BD 発症内因子としての疾患感受性遺伝子の検討

BD の発症に HLA-B51 とその対立遺伝子 HLA-B*510101 は疾患感受性遺伝子として重要であるが、一方では約 40% の患者が HLA-B51 陰性である。このことから、さらに HLA-B51 遺伝子以外の関連遺伝子とその周辺においても検討する必要がある。436 検体の pooled DNA を用いて全ゲノムを網羅する多型性豊富な約 3 万個のマイクロサテライト (MS) マーカーによる検討を行い、MS マーカーの陽性部 100kb 内外まで絞り込んだ部分に、HLA-B51 遺伝子以外にも 147 個の陽性部の存在が確認された。今後、これらについて SNP (single nucleotide polymorphism) 解析を行って確認する必要がある。

2. BD 発症内因子と病変部病態に関する検討

1) Th1 型免疫反応

BD 病変部には、既に前述したように NK 細胞、CD8⁺T 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞などの細胞傷害性 T 細胞 (killer activating receptor, NKG2D 発現) の浸潤により組織傷害が起こされることが指摘されている。しかし、これまでに BD 患者の病期と HLA-B51 の関連については不明の域を出なかったが、標的組織細胞がストレスを受けると MICA*009 の発現が誘導され、これに対して HLA-B51 拘束性 NKG2D 発現細胞傷害性 T 細胞が MICA 発現標的組織細胞を傷害することが明らかになってきた。すなわち、BD 患者の活動期には、MICA 反応性 CD8⁺T 細胞が検出され、これらの細胞による MICA 遺伝子を介した組織傷害が招来されることが明らかにされ、HLA-B51 を有する BD 患者における重症度との関連が示唆された。NK 細胞については、NK1, NK2 の偏奇に関して検討したところ、非活動期には NK2 が優位で、Th1 反応の抑制に作用している可能性が示唆される。

2) BD 患者における補体系反応と HLA-B51

BD 患者の血清中の補体系は非活動期に高く、活動期に低下する。補体系の反応は、生物における自然免疫系に重要な役割を演じていることは衆知の事実である。特に、最近その存在が明らかに

されたレクチン経路は mannose-lectin-ficolin の反応を伴い細菌細胞膜上に展開される補体活性化経路のひとつとして報告された。このレクチン経路について BD 患者の HLA-B51陽性群と陰性群とで ficolin-2遺伝子多型を検討すると、HLA-B51陽性群に頻度が高く (-557A > G, -64A > C)、遺伝子多型がみとめられた。BD 患者では血清中の ficolin-2濃度は健常人のそれに比べ低値である。この所見は、BD 患者では、補体系の自然免疫系反応が亢進していることを示唆している。

3. 細胞傷害性T細胞と組織傷害の指標に関する検討

1) 病変部の炎症とバイオマーカー

BD 患者の病変部における炎症部には既に前述した granulysin, granzyme B, perforin などが放出され、それらの炎症マーカーが検出されるが、さらに好中球、単球、マクロファージなどから分泌されるカルシウム結合性低蛋白である S100A8/9複合体の存在も自己免疫性疾患の病変では proinflammatory mediator として検出される。同様に BD にも活動期の血清に上昇しており、病変部の反応の病態解析に興味があるところである。

2) 細胞傷害性サイトカインと BD 病変

BD 患者の病変部、すなわち眼病変、皮膚・粘膜病変、腸管病変などには TNF- α , INF- γ , IL-1, IL-6, IL-8などのサイトカインが分泌されて、これらが組織傷害を招来し、種々の病変を起こすものと考えられる。同様に神経型 BD 患者の髄液、血清ならびに血液中の単球から TNF- α , IL-6, IL-8の分泌が発作時に高値になることが認められた。このことは、眼病変の進行抑制に抗 TNF- α 抗体が治療薬として有効であることが確認されたように神経型 BD においても、抗 TNF- α 抗体による治療が有効なことを示唆している。

3) HSP-65/60と BD 病変

BD 発症外因子の一つとして想定される、*S. sanguinis* 由来 HSP-65と反応性のヒト HSP-60が BD 病変部に存在することと、HSP-65は BD 患者 PBMC を特異的に刺激することが既に明らかにされている。しかし、これらの BD 病変形成に関する役割については未だ不明の域を出ないが、*S. sanguinis* の抽出 DNA である Bes-1 DNA が皮膚・

粘膜病変から検出されている。

HSP-65/60の両者にはそのアミノ酸の塩基配列に相同部が存在することと、T細胞エピトープとの結合部分が明らかにされた。興味あることは、前述した英国の Lehner らのグループは HSP-65/60の相同部 p336-351の製剤が、BD の進行性ぶどう膜炎患者に効果的であったと報告したことから、われわれは HSP-65/60相同部、T細胞エピトープ結合部ペプチドを合成し、それらを加えると活動性 BD 患者 PBMC の産生する TNF α , IL-6, IL-8が抑制されることを確認した。現在、PBMC の HSP ペプチドとの結合受容体について解析を行っている。

4. 自然免疫機序の関与

既に腸管型 BD 病変の免疫組織学的所見では浸潤単核細胞に TLR2, 4の発現が見られ、また CpG DNA によって BD 患者の PBMC が刺激され、BD 患者では TLR9の発現が推定されている。このたびは、BD 患者における TLR9遺伝子多型を検討すると -1486C, 1174G の位置で高い傾向が見られた。細菌由来抗原に対する自然免疫機序の関与を強く示唆し、BD では TLR2, 4, 9の役割が明らかになりつつある。

5. 効率的な治療法開発への挑戦

1) 既存治療法の見直しと展望

ステロイド療法、シクロスポリン (CYA) の治療に関する検討は前述した。特に CYA に関して感受性に個体差がみられることから、その感受性遺伝子の発現の多型について検討し、カルシヌリンを介したT細胞内の IL-2転写因子と CYA の関係について検討中である。

2) 炎症時に出現する抗炎症因子の利用

侵入病原体に対して、その侵入を抑止する自然免疫機構においては様々な抗菌因子が作用する。その内のひとつの CAPI18/LL37は白血球由来蛋白である。このものは抗菌作用と抗炎症作用によりエンドトキシンショックに対する治療効果があることが報告されており、特にそのC末端側27個のアミノ酸からなるペプチドは細菌由来 lipopolysaccharide (LPS) と結合することが明らかにされている。既に、BD の発症外因子とされる

S. sanguinis の発育を抑制することがみられており、また動物モデルのEAUの抑制作用が示唆され、治療薬としての期待がもてる。一方、CAP18/LL37と同様の作用を有する ceragenin (CSA-13) の作用についても検討を行っている。

Heme oxygenase (HO)-1はhemeをCOとビリベルジンと2価鉄とに分解されると出現する、ストレス誘導性蛋白のひとつである。既にHO-1は抗炎症作用を示すことが明らかにされている。TNF- α 産生能に関して、これまでの成績から炎症細胞からのTNF- α 産生能を抑制することが明らかであり、BD患者の発作時に上昇するTNF- α の抑制に利用が期待される。また、自然免疫に関与するTLR2, 4にも影響を与える結果が出てきている。

3) 生物製剤による治療

BDの病変形成にINF- α を中心とした炎症性サイトカインの関与が明らかである。同様に、関節リュウマチ、クローン病においてもINF- α が炎症の役割を演じ、これらの疾患においては既にキメラ型抗INF- α 抗体(インフリキシマブ)による治療で良好な臨床結果が得られている。BDでは、特に従来の治療法に抵抗性のある「ぶどう膜炎」の患者に試行され、その鎮静化に良好な結果が得られた。このたびインフリキシマブ(レミケード)の効能にBD患者のぶどう膜炎の治療が追加された。

4) その他の治療薬の開発

オステオポンチン(osteopontin: OPN)はTh1型免疫応答に関与し、細胞外マトリクス蛋白としてサイトカインとしても機能し、Th1型反応をTh2型反応に偏向する作用を示す多面的生体活性物質である。OPNは動物モデルであるEAUを軽症化する作用がみられたことから、BD患者に将来的に治療に使用できる可能性がある。

III. BDの疫学調査

1. 最近の調査のまとめ(全疫学研究班と共同で実施。)

1) 全国調査について

2003年1月に全国疫学調査を実施し、2004年度に分析結果を報告した。すなわち、2002年1年間の全国のBD病受療患者数は15,000人(95%信頼

区間14,000-16,000)、男7,000人(95%信頼区間6,500-7,500)、女8,000人(95%信頼区間7,500-8,500)と推計された。過去の全国調査結果と比較すると、1972年から1991年まで推計患者数は増加していたが今回減少した。減少理由は不明であるが、医療費受給者数も2001年をピークに減少している。受療しない軽症者の割合が増加している可能性がある。

二次調査結果(1,884例)を過去の全国調査結果と比較すると、平均年齢は男47.8歳、女51.3歳、1972年より約10歳高い。平均発症年齢はほぼ横ばいである。重症、中等度の割合は男が多く、1972年と比べて入院割合は10%から0.7%に減少していた。1972年以降完全型BDの割合減少、皮膚症状、眼症状は20%以上減少し、外陰部潰瘍は女性の約2割、男性の約3割で減少している。治療法は11年間で漢方薬の使用が減少し、経口ステロイドの使用が増加した。

2) QOL調査について

全国疫学調査対象の192施設がQOL調査(SF36ver2)に参加した。2003年11月に調査開始し、2004年末まで回収した。2005年度に分析すると、BD病患者のQOLは国民標準値より低く、重症者、高齢、薬剤投与後の臨床症状(進行・無反応者)、「結節性紅斑様皮疹、外陰部潰瘍などが有り」で、「最近1ヶ月間の活動性の状態が有り」でQOLは低かった。2006年度フォローアップ調査を実施している。

3) 臨床調査個人票データの分析

平成16年度データ約8,400例について分析すると、重症、特殊型BD、薬剤投与後(進行・無反応・副作用出現)、HLA-B51陽性割合(新規)が、いずれも男性で高かった。平成15-16年度のデータの約1,600例を用いて予後の検討が可能かどうか試行したところ、1年間のStage(重症度)の変化を確認した。1年間でStageに「変化なし」73.9%、「軽快」5.9%、「悪化」6.1%、「非継続」13.3%であった。Stageが高くなるに従って悪化の割合が減少した。平成15年度では、症状なしとStage V(生命予後に危険あり)の非継続率が3割強と高かった。正確な予後の検討には非継続の理由(治癒、死亡)を確認することが重要である。

2. 口腔保健と QOL

口腔内アフタは BD 症状の主症状のひとつであり、BD 患者の90~100%に出現し、症状による疼痛や不快感が口腔清掃をはじめとする保健行動に影響を及ぼしている。このことから、不十分な口腔管理により、QOL の低下にもつながると考えられる。このたび、無作為抽出により15~79歳の男女2,400名を対象に調査し、得られた結果を基に BD 患者のデータと比較検討した。その結果、BD 患者の口腔関連 QOL は一般集団と比べて有意に低いことが示された。

IV. 次年度への研究の展望

1. BD 発症の内因子（疾患感受性遺伝子）の詳細な検討を継続する。
2. 発症に関わる外因子の研究、特に HSP-65/60の役割とそれらの相同部ペプチドと T細胞受容体との関係の検討から新しい治療法への展望を開きたい。
3. BD の病態の解明、特に Th1型細胞傷害性細胞の解析と Th2型への偏向に関する検討を行う。
4. 腸管型 BD, 神経型 BD, 血管型 BD など、いわゆる特殊型 BD の診断基準と治療のガイドライン作成を完成させたい。
5. 新しい生物製剤による治療法のガイドライン作成と新しい治療法の開発を継続する。
6. 疫学調査と QOL 調査を継続する。

III. 分担研究報告

疾患感受性遺伝子（発症内因子）

ゲノムワイドなマイクロサテライトによる相関解析を用いた ベーチェット病の感受性遺伝子の検索に関する研究

分担研究者 猪子 英俊 (東海大学医学部基礎医学系分子生命科学教授)
研究協力者 目黒 明 (横浜市立大学医学部眼科学)
岡 晃 (東海大学医学部分子生命科学2)
勝山 善彦 (信州大学医学部法医学)
太田 正穂 (信州大学医学部法医学)
竹本 裕子 (北海道大学大学院医学研究科視覚器病学)
南場 研一 (北海道大学大学院医学研究科視覚器病学)
大野 重昭 (北海道大学大学院医学研究科視覚器病学)
西田 朋美 (聖隷横浜病院眼科)
伊藤 良樹 (横浜市立大学医学部眼科学)
伊藤亜紀子 (横浜市立大学医学部眼科学)
伊藤 典彦 (横浜市立大学医学部眼科学)
水木 信久 (横浜市立大学医学部眼科学)

研究要旨

ベーチェット病は人種を超えてHLA-B51抗原と顕著に相関することが知られているが、本病発症にはHLA-B51対立遺伝子以外の他の遺伝子も関与してい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 (MS) マーカーを用いて、ゲノムワイドに疾患感受性遺伝子スクリーニングを行うことにより、HLA-B51対立遺伝子以外の本病感受性遺伝子の同定を試みている。これまでにすべてのMSマーカーにおいて第1次～第3次の3段階のpooled DNAスクリーニングを完了し、147個の陽性MSマーカーが得られている。現在、これら147個のMSマーカーについて、pooled DNAに使用した300検体を用いた個別タイピングにより、陽性MSマーカーの確認を行うとともに、陽性の確認されたMSマーカーの100kb内外のゲノム領域についてSNP解析を行っている。

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作用して発症する多因子疾患と考えられている。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が、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対立遺伝子以外の他の遺伝子も関与している可能性が

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約3万個の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対立遺伝子以外の他の本病感受性遺伝子の同定を試みている。

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MSマッピング法を用いる。MSとはゲノム上に散在する数塩基単位の反復配列のことで、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MSマーカーにおける対立遺伝子分

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。すでに我々は全ゲノムを網羅する多型性豊富な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および北海道大学附属病院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、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ケンサー(ABI PRISM 3700 DNA Analyzer)で電気泳動し、波形解析後、MSの対立遺伝子分布を決定する。マーカー毎に患者群と健常群の対立遺伝子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。

本MSマッピングでは、偽陽性を防ぐために3段階(1次~3次pooled DNA)の解析(pooled DNAスクリーニング)を行い、独立した3集団のすべてにおいて、患者群と健常群の比較で有意差を認めたMSマーカーのみを本病と相関する陽性MSマーカーとする。得られた陽性MSマーカーについて、pooled DNAに使用した全300検体を用いた個別タイピング(individual DNAタイピング)による陽性の確認を行い、真の陽性MSマーカーを決定し、疾患感受性領域を絞り込む。

(倫理面への配慮)

すべての血液提供者に対して研究の目的、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

現在までに総計436の患者サンプルを収集した(表1)。総サンプルの情報を反映するように100サンプルを抽出し、独立した3集団のpooled DNAを作成した。対照群は患者群と性を合わせた健常者を用いた(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23,465個すべてのMSマーカーについて3段階のpooled DNAスクリーニングを行った。その結果、約0.6%の147個のMSマーカーが3集団すべてにおいてP値0.05未満の陽性を示した(表3、図1)。

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。ヒトの全ゲノム塩基配列は3.1GB(31億塩基対)であり、すでに我々は100kb(MSの連鎖不平衡の距離)毎に全ゲノムをカバーする多型性豊富なMS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、全染色体を網羅する23,465個すべての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で判定して陽性MSマーカーは約0.6%の147個であった。言い換えれば、本病の感受性領域を全染色体の約0.6%まで絞り込んだことになる。本病と強い相関が知られているHLA-B遺伝子から36kb近傍に位置するMS

マーカーが本病と顕著に相関しており、このMSマーカーがHLA-B遺伝子と強い連鎖不平衡にあることが推測される。このことから、残り146個のいずれかのMSマーカーの近傍領域にも本病の感受性遺伝子が存在することが示唆される。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、現在、pooled DNAに使用した検体を用いたindividual DNAタイピングによる陽性の確認を行っている。今後、individual DNAタイピングにおいて抽出される真の陽性MSマーカーについて、各々100kb内外の領域のSNP解析を行い、疾患感受性遺伝子の同定を試みる。

E. 結 論

今回、全染色体のpooled DNAスクリーニングが終了し、147個の陽性MSマーカーが得られた(陽性率は約0.6%)。本病との顕著な相関が知られているHLA-B遺伝子の近傍に位置するMSマーカーが陽性を示したことから、残り146個のいずれかのMSマーカーの近傍領域にも本病の疾患感受性遺伝子が存在することが示唆された。今後、individual DNAタイピングを進め、疾患感受性領域を絞り込むことで、多因子性疾患であるパ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18年度)

- 1) Nakanishi K, Inoko H: Combination of HLA-A24, -DQA1*03, and -DR9 contributes to acute-onset and early complete β -cell destruction in type 1 diabetes: longitudinal study of residual β -cell function. *Diabetes* (2006) 55: 1862–1868.
- 2) Ohtsuka M, Ishii K, Kikuti YY, Warita T, Suzuki D, Sato D, Kimura M, Inoko H: Construction of mouse 129/Ola BAC library for the targeting experiments using E14 embryonic stem cells. *Genes Genet Syst* (2006) 81: 143–146.
- 3) Shiina T, Ota M, Shimizu S, Katsuyama Y, Hashimoto N, Takasu M, Anzai T, Kulski JK, Kikkawa E, Naruse T, Kimura N, Yanagiya K, Watanabe A, Hosomichi K, Kohara S, Iwamoto C, Umehara Y, Meyer A, Wanner V, Sano K, Macquin C, Ikeo K, Tokunaga K, Gojobori T, Inoko H, Bahram S: Rapid Evolution of MHC Class I Genes in Primates Generates New Disease Alleles in Man Via Hitchhiking Diversity. *Genetics* (2006) 173: 1555–1570.
- 4) Renard C, Hart WE, Sehra HK, Beasley HR, Coggill PC, Howe KL, Harrow JL, Gilbert JGR, Sims S, Rogers JR, Ando A, Shigenar A, Shiina T, Inoko H, Chardon P, Beck S: The Genomic Sequence and Analysis of the Swine Major Histocompatibility Complex. *Genomics* (2006) 88: 96–110.
- 5) Kawashima M, Tamiya G, Oka A, Hohjoh H, Juji T, Ebisawa T, Honda Y, Inoko H, Tokunaga K: Genomewide association analysis of human narcolepsy and a new resistance gene. *Am J Hum Genet* (2006) 79: 252-263.
- 6) Sano K, Shiina T, Shimizu S, Anzai T, Kulski JK, Inoko H: Novel cynomolgus macaque MHC-DPB1 polymorphisms in three South-East Asian populations. *Tissue Antigens* (2006) 67: 297–306.
- 7) Ikewaki I, Kulski JK, Inoko H: Regulation of CD93 cell surface expression by protein kinase C isoenzyme. *Microbiol Immunol* (2006) 50: 93-103.
- 8) Koishi S, Yamamoto K, Matsumoto H, Koishi S, Enseki Y, Oya A, Asakura A, Aoki Y, Atsumi M, Iga T, Inomata J, Inoko H, Sasaki T, Nanba E, Kato N, Ishii T, Yamazaki K: Serotonin transporter gene promoter polymorphism and autism: a family-based genetic association study in Japanese population. *Brain Development* (2006) 28: 257–260.
- 9) Dunn DS, Inoko H, Kulski JK: The association between non-melanoma skin cancer and a young dimorphic Alu element within the major histocompatibility complex class I region. *Tissue Antigens* (2006) 68: 135–146.
- 10) Reinders J, Rozemuller EH, van der Weide P, Oka A, Slootweg PJ, Inoko H, Tilanus MG: Genes in the

HLA region indicative for head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Immunol* (Epub) (2006).

11) Luo M, Kim H, Kudrna D, Sisneros NB, Lee SJ, Mueller C, Collura K, Zuccolo A, Buckingham EB, Grim SM, Yanagiya K, Inoko H, Shiina T, Flajnik MF, Wing RA, Ohta Y: Construction of a nurse shark (*Ginglymostoma cirratum*) bacterial artificial chromosome (BAC) library and a preliminary genome survey. *BMC Genomic* (2006) 7: 106.

12) Itoh Y, Inoko H, Kulski JK, Sasaki S, Meguro A, Takiyama N, Nishida T, Yuasa T, Ohno S, Mizuki N: Four-digit allele genotyping of the HLA-A and HLA-B genes in Japanese patients with Behcet's disease by a PCR-SSOP-Luminex method. *Tissue Antigens* (2006) 67: 390 – 394.

13) Mizuta I, Satake W, Nakabayashi Y, Ito C, Suzuki S, Momose, Nagai Y, Oka O, Inoko H, Fukae J, Saito Y, SawabeM, Murayama S, Yamamoto M,

Hattori N, Murata M, Toda T: Multiple candidate gene analysis identifies a-synuclein as a susceptibility gene for sporadic Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* (2006) 15: 1151 – 1158.

14) Watanabe M, Nikaido M, Tsuda TT, Inoko H, Mindell DP, Murata K, Okada N: The rise and fall of the CR1 subfamily in the lineage leading to penguins. *Gene* (2006) 365: 57 – 66.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許申請
 名称：摂食障害の検査用マーカー遺伝子
 発明者：猪子英俊, 白澤専二
 出願日：2006年7月25日
 出願人：東海大学
 国内出願番号：2006-201944

表1 サンプル収集状況

横浜市立大学	116	北海道大学	85
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	183
総計			426

表2 pooled DNA 検体情報

	1st 100検体		2nd 100検体		3rd 100検体	
	疾患群	健常群	疾患群	健常群	疾患群	健常群
男/女	57/43	57/43	58/42	58/42	58/42	58/42
平均発症年齢	33.9歳		35.1歳		33.6歳	
完全型/不全型	46/54		45/55		45/55	
主症状						
口腔内アフタ	100		97		98	
皮膚症状	87		87		87	
眼症状	89		88		91	
外陰部潰瘍	61		61		62	
副症状						
関節炎	42		37		33	
副睾丸炎	5		8		7	
消化器症状	16		10		10	
血管病変	1		4		3	
中枢神経病変	8		9		9	
HLA – B51陽性	56	15	55	15	55	15

表3 1次スクリーニング結果

chr.	1次スクリーニング		2次スクリーニング		3次スクリーニング	
	実験マーカー	陽性マーカー	実験マーカー	陽性マーカー	実験マーカー	陽性マーカー
1	1895	192	192	50	50	20
2	2053	153	153	41	41	10
3	1650	128	128	30	30	11
4	1554	127	127	26	26	11
5	1500	101	101	17	17	5
6	1369	127	127	24	24	13
7	1370	110	110	22	22	5
8	1103	95	95	19	19	7
9	956	68	68	15	15	3
10	1097	95	95	12	12	7
11	1076	68	68	17	17	11
12	1128	100	100	19	19	9
13	806	62	62	13	13	3
14	709	56	56	12	12	8
15	610	52	52	9	9	3
16	631	55	55	8	8	3
17	626	72	72	4	4	3
18	649	47	47	12	12	2
19	454	64	64	13	13	2
20	501	46	46	10	10	2
21	296	25	25	4	4	2
22	251	29	29	7	7	4
X	1105	46	46	5	5	3
Y	76	1	1	1	1	0
total	23465	1919	1919	390	390	147
%	100	8.2	8.2	1.7	1.7	0.6

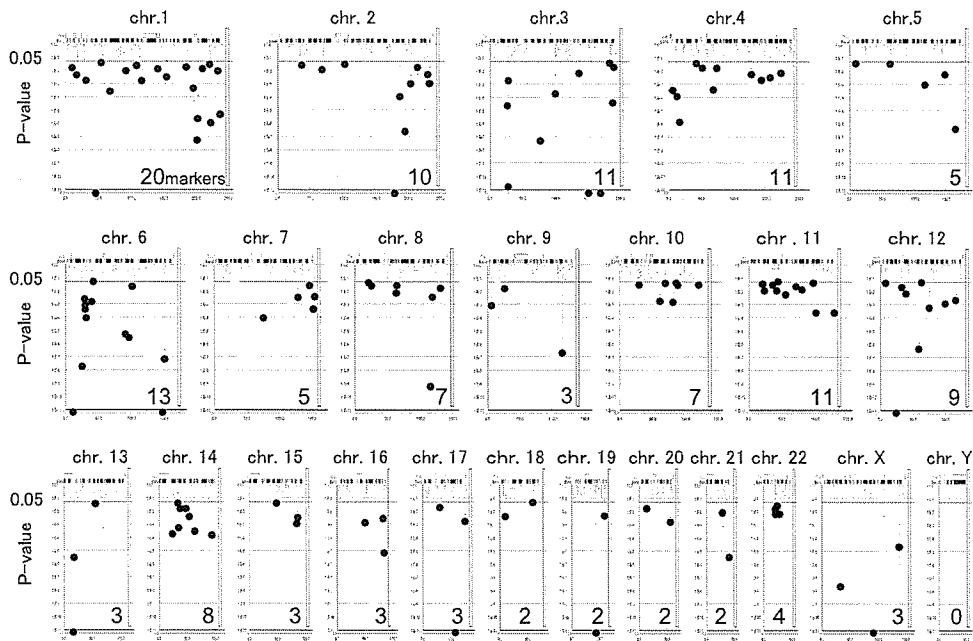


図1 陽性マイクロサテライトマーカーの染色体上の分布
● : P値0.05未満の陽性マーカーを黒丸で示した。

PCR-Luminex 法を用いた日本人ベーチェット病患者における 症状別 HLA 遺伝子解析に関する研究

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)
研究協力者 上石 智子 (横浜市立大学大学院医学研究科視覚器病態学)
伊藤 良樹 (横浜市立大学大学院医学研究科視覚器病態学)
目黒 明 (横浜市立大学大学院医学研究科視覚器病態学)
西田 朋美 (横浜市立大学大学院医学研究科視覚器病態学)
南場 研一 (北海道大学大学院医学研究科視覚器病学)
大野 重昭 (北海道大学大学院医学研究科視覚器病学)
猪子 英俊 (東海大学分子生命科学遺伝情報部門)

研究要旨

PCR-Luminex 法を用いて、日本人ベーチェット病 (BD) 患者の HLA-A および -B 遺伝子のアレルタイピングを行い、病型および症状別に解析した。日本人 BD 患者389人と健常者254人を対象とし、ゲノム DNA を PCR-Luminex 法によりアレルタイピングを行った。それらを完全型、不全型、眼症状の有無、皮膚症状の有無の群に分類し解析したところ、病型、眼および皮膚症状別の解析でいくつかのアレルで有意差がみられた (完全型: A*2601, A*3303, B*5101, B*5401; 不全型: B*5101, B*5401; 眼症状有り群: A*2601, A*3303, B*4403, B*5101, B*5401; 眼症状無し群: A*0206, B*5101; 皮膚症状有り群: A*3303, B*5101, B*5401; 皮膚症状無し群: A*2602, B*5101)。これらの結果を B*51陰性群で再解析したところ、以下のアレルにおいて有意差がみられた (完全型: A*2601; 眼症状有り群: A*2601, B*5401; 皮膚症状有り群: A*2601)。以上の結果より、B*51陰性群で再解析して有意差が消失したアレルは、B*51との連鎖不平衡による二次的なものと考えられた。一方で A*2601は B*51と連鎖不平衡はなく B*51陰性群でも有意に増加していたことから A*2601が本病の病型、眼症状、皮膚症状の病態形成に関与する B*5101以外の第二の疾患感受性遺伝子である可能性が考えられた。

A. 研究目的

PCR-SSOP-Luminex 法により日本人ベーチェット病 (BD) 患者の HLA-A および -B 遺伝子のアレルタイピングを行い、BD 患者と健常人とのアレル保有率の比較、HLA-B*51陰性群でのアレル保有率の比較し、それらを病型および症状別に解析し検討したので報告する。

B. 研究方法

PCR-SSOP-Luminex 法を用いて末梢血より抽出した DNA を用いて、日本人 BD 患者と健常者の 4 桁アレルタイピングを行った。BD 患者と健常人のアレル保有率を完全型・不全型、眼症状の有

無、皮膚症状の有無に分けて比較した。また、BD は B*51アレルと強い相関が報告されているため、B*51アレルを持たない BD 患者と健常者でその他の HLA アレル保有率を病型、症状別に比較・検討した。

(倫理面への配慮)

本病患者および健常者 1 人 1 人に対し、本研究の主旨を説明し、遺伝子解析を行うことに対する同意を得た上で採血を行った。

C. 研究結果

[対 象]

横浜市立大学眼科または北海道大学眼科ぶどう