

図1 Pooled DNA スクリーニングで得られた147個の陽性マイクロサテライトマーカーの分布
 ● : P値0.05未満の陽性マーカーを黒丸で示した。

表1 本病と真に相関を示す6個の陽性マイクロサテライトマーカー

| マイクロサテライト | 染色体 | P 値 | | | | |
|-----------|----------|--------------------|---------|---------|----------------|---------|
| | | Pooled DNA (2 x 2) | | | Individual DNA | |
| | | 1次 | 2次 | 3次 | 2 x 2 | 2 x m |
| D3S0186i | 3p12 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | 0.029 | 0.15 |
| D6S0014i | 6p21.3 | 0.002 | 0.0003 | 0.003 | <0.0001 | <0.0001 |
| D6S0032i | 6p21.3 | <0.0001 | 0.0002 | 0.0005 | <0.0001 | <0.0001 |
| 536G12A | 6q25.1 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | 0.031 | 0.111 |
| D12S0645i | 12p12.1 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | 0.024 | 0.364 |
| D22S0104i | 22q11.22 | <0.0001 | <0.0001 | 0.006 | 0.019 | 0.125 |

HLAクラス I 領域における疾患感受性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学教室）
研究協力者 目黒 明（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）
西田 朋美（聖隷横浜病院眼科）
勝山 善彦（信州大学付属病院薬剤部）
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）
岡 晃（東海大学医学部分子生命科学）
猪子 英俊（東海大学医学部分子生命科学）

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。研究協力者である東海大の猪子教授らは全染色体網羅する 23,465 個のマイクロサテライト (MS) を用いてゲノムワイドに疾患感受性遺伝子解析を行った結果、6 番染色体の HLA クラス I 領域内に本病と顕著な相関を示す 2 個の MS を検出した。そこで我々は HLA クラス I 領域内を網羅的に調査するため、計 20 個の MS と 5 個の HLA 遺伝子の多型解析および連鎖不平衡解析を行い、HLA-B 遺伝子以外の他の疾患感受性遺伝子の存在を検討した。

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、本病発症には HLA-B51 対立遺伝子 (アリル) 以外の他の遺伝子も関与している可能性が示唆される。研究協力者である東海大の猪子英俊教授らは全染色体を網羅する多型性豊富な 23,465 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な疾患遺伝子スクリーニングを行った結果、本病と相関を示す 6 個の MS を同定した。6 個の MS のうち、6 番染色体短腕上の HLA クラス I 領域内に位置

する 2 個の MS, D6S0014i と D6S0032i が本病と顕著に相関していた。D6S0032i は HLA-B 遺伝子の 36kb 近傍に位置しているため D6S0032i と本病の顕著な相関は HLA-B 遺伝子との強い連鎖不平衡 (LD) に起因するものであることが推測されたが、もう一方の MS, D6S0014i は HLA-B 遺伝子から 1.1Mb 以上離れた位置に存在するため、D6S0014i の近傍に HLA-B 遺伝子以外の他の疾患感受性遺伝子が存在することが強く示唆された。そこで我々は HLA クラス I 領域内に存在する疾患感受性遺伝子および遺伝変異を網羅的に調査するため、D6S0014i と D6S0032i を含む計 20 個の MS と 5 個の HLA 遺伝子の多型解析および LD 解析を行い、HLA クラス I 領域に存在する HLA-B 遺伝子以外の他の疾患感受性遺伝子の検討を行った。

B. 研究方法

本多型解析では、患者群および健常群ともに猪子教授らのゲノムワイドな MS マッピングで使用された検体と同一の300検体を対象に HLA クラス I 領域を網羅するように設定された D6S0014i と D6S0032i を含む計20個の MS と 5 個の HLA 遺伝子, HLA-A, HLA-B, HLA-E, HLA-F および HLA-G (図 1 A) について相関解析と LD 解析を行った。

(倫理面への配慮)

全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。得られた個人情報に連結匿名化の上, 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

HLA クラス I 領域を網羅する20個の MS と 5 個の HLA 遺伝子について多型解析を行った結果, 18個の MS と HLA-E 遺伝子を除く 4 個の HLA 遺伝子が本病と有意に相関した (図 1 B)。HLA-B 遺伝子が最も強固な相関を示し ($P_c = 1.63 \times 10^{-24}$), HLA-B 遺伝子近傍の MS も同様に顕著な相関を示した。また, HLA-B 遺伝子から約1.5Mb 離れた HLA-F と HLA-G 遺伝子および 3 個の MS を含む約 200kb の領域が本病と強く相関していた (HLA-F, $P_c = 1.83 \times 10^{-8}$; HLA-G, $P_c = 1.44 \times 10^{-6}$)。HLA-A 遺伝子も本病と有意な相関を示したものの顕著な相関ではなかった ($P_c = 0.0035$)。

HLA-B 遺伝子による LD の影響を除外するため, 患者群で顕著な増加が観察された HLA-B*5101 アリルを保有しない患者群136人と健常群255人を対象に相関解析を行った結果 (図 1 C), HLA-B 遺伝子近傍で観察された本病との顕著な相関は消失した。対照的に, HLA-A, HLA-F および HLA-G 遺伝子を含む約800kb の領域が HLA-B*5101 に依存することなく本病と強く相関した。HLA-A*2601,

HLA-F*010101 および HLA-G*010102 アリルが患者群で有意に増大した (A*2601: OR = 2.61, $P_c = 5.11 \times 10^{-4}$; F*010101: OR = 1.87, $P_c = 1.55 \times 10^{-4}$; G*010102: OR = 2.24, $P_c = 1.16 \times 10^{-4}$)。一方, HLA-A*3303, HLA-F*010102 および HLA-G*010401 アリルが患者群で有意に減少した (A*3303: OR = 0.34, $P_c = 0.0034$; F*010102: OR = 0.40, $P_c = 2.09 \times 10^{-5}$; G*010401: OR = 0.56, $P_c = 2.41 \times 10^{-3}$)。

20個の MS と 5 個の HLA 遺伝子について LD 解析を行ったところ, HLA-A, HLA-F および HLA-G 遺伝子を含む約400kb の領域で HLA-B 遺伝子から独立した強固な LD が観察された。HLA-B*5101 陰性群における HLA-A, HLA-F および HLA-G の 3 遺伝子のハプロタイプ解析を行ったところ (表 1), 患者群で有意な増加を示した HLA-A*2601, HLA-F*010101 および HLA-G*010102 から構成されるハプロタイプが患者群で有意に増大した (OR = 2.68, $P_c = 1.30 \times 10^{-3}$)。さらに HLA-F*010101, HLA-G*010102 および全ての HLA-A*26 サブタイプからなるハプロタイプが患者群でより有意に増大した (OR = 3.08, $P_c = 9.88 \times 10^{-7}$)。

D. 考 察

本研究では, HLA クラス I 領域内の疾患感受性を解明するため, 患者群および健常群ともに300検体ずつを対象に HLA クラス I 領域を網羅する 20 個の MS と 5 個の HLA 遺伝子について相関解析および LD 解析を行った。既報の通り, HLA-B 遺伝子 (HLA-B*5101 アリル) が本病と最も強固に相関していた。一方, HLA-B*5101 陰性群を対象とすると, HLA-A, HLA-F, HLA-G 遺伝子およびこれら 3 遺伝子近傍の MS が本病との強固な相関を示した。HLA クラス I 領域内の LD 解析および HLA-A, HLA-F, HLA-G の 3 遺伝子を対象としたハプロタイプ解析を考慮すると, HLA-A*2601, HLA-F*010101 および HLA-G*010102 アリルのいずれかが HLA-B 遺伝子に依存することなく本病発症のリスクを増大させる主要な疾患感受性遺伝子であることが示唆された。

HLA-F 遺伝子では, HLA-F*010101 アリルが患者群で有意に増加していたものの, 同一のアミノ

酸で構成される HLA-F*010102 アリルは患者群で有意に減少していた。また、HLA-G 遺伝子では HLA-G*010102 アリルが患者群で有意に増加しているのに対し、同一のアミノ酸で構成される他の HLA-G*0101 サブタイプは G*010102 アリルと同様の傾向を示さなかった。このことから患者群で観察される HLA-F*010101 と HLA-G*010102 の顕著な増加は近接する真の疾患感受性遺伝子との LD の影響によるものと考えられた。HLA-F*010101 と HLA-G*010102 は HLA-A*26 サブタイプ (HLA-A*2601 ~ A*2605) と強固に連鎖しているため、HLA-A*26 サブタイプが本病と関連する真の疾患感受性遺伝子であり、その LD により HLA-F*010101 と HLA-G*010102 が本病と有意に関連することが推測された。実際、HLA-A2601 ~ A2605 を総合した HLA-A26 サブタイプについて HLA-B*5101 陰性群で比較すると (表 2)、HLA-A26 サブタイプが本研究で解析した全てのアリルの中で最も強く本病と関連しており、HLA-A*26 サブタイプが HLA-B 遺伝子に依存しない本病の疾患感受性遺伝子であることが示唆された。

E. 結 論

HLA クラス I 領域を網羅する 20 個の MS と 5 個の HLA 遺伝子について多型解析を行った。観察されたアリルの相関解析および LD 解析により、HLA-A*26 サブタイプが HLA-B*5101 アリルに依存しない本病の疾患感受性遺伝子であることが考えられた。今後、他民族において同様の解析を進め、HLA クラス I 領域内に存在する本病の疾患感受性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

論文発表

1. Matusda A, Ebihara N, Kumagai N, Fukuda K, Ebe K, Hirano K, Sotozono C, Tei M, Hasegawa K,

Shimizu M, Tamari M, Ohno S, Mizuki N, Ikezawa Z, Shirakawa T, Hamuro J, Kinoshita S: Functional SNPs in the promoter of the IFNGR1 gene are associated with ocular complications of atopic dermatitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48(2): 583-589, 2007.

2. Hayashi T, Inoko H, Nishizaki R, Ohno S, Mizuki N: Exclusion of the transforming growth factor-beta1 as a candidate gene for high myopia in the Japanese. *Jpn J Ophthalmol* 51(2): 96-99, 2007.

3. Teshigawara T, Hata S, Hitoi K, Watanabe Y, Ito Y, Mizuki N: Penetration of gatifloxacin eye drop into the aqueous humor in humans. *Ocular Immunol Inflamm*, 15: 309-313, 2007.

4. Yatsu K, Mizuki N, Hirawa N, Oka A, Ito N, Yamane T, Ogawa M, Shiwa T, Tabara Y, Ohno S, Soma M, Hata A, Nakano K, Ueshima H, Ogihara T, Tomoike H, Miki T, Kimura A, Mano S, Kulski JK, Umemura S, Inoko H: High-resolution mapping for essential hypertension using microsatellite markers. *Hypertension* 49(3): 446-452, 2007.

5. Inamori Y, Ota M, Inoko H, Okada E, Kulski JK, Nishizaki R, Shiota T, Mok J, Oka A, Ohno S, Mizuki N: Collagen type I alpha 1 are associated with high myopia in Japanese: single-nucleotide polymorphisms analysis. *Hum Genet* 122(2): 151-157, 2007.

6. Ito A, Ota M, Katsuyama Y, Inoko H, Ohno S, Mizuki N: Lack of association of Toll-like receptor 9 gene polymorphism with Behcet's disease in Japanese patients. *Tissue Antigens* 70(5): 423-426, 2007.

7. Mizuki N, Meguro A, Tohna I, Gul A, Ohno S, Mizuki N: Association of MICA and HLA-B Alleles with Behcet's Disease in Turkey. *Jpn J Ophthalmol* 51: 431-436, 2007.

8. Omoto S, Kuroiwa Y, Wang C, Li M, Mizuki N, Hakii Y: The effect of attended color on the P1/N1 component of visual event-related potentials. *Neurosci Lett*. 2007 Oct 11; [Epub ahead of print]

9. Katsuyama Y, Ota M, Mizuki N, Ito A, Okada E, Ohno S, Matsunaga T, Ohmori S: MDR1 polymorphisms effect cyclosporine AUC0-4 in Behcet's disease

- patients. *Clinical Ophthalmol* 1(3): 297-303, 2007.
10. Sasaki S, Inoko H, Ota M, Katsuyama Y, Okada E, Hasumi Y, Hayashi T¹, Inamori Y, Nishizaki R, Mok J, Oka A, Kimura T, Kulski JK, Ohno S, Mizuki N: A Single Nucleotide Polymorphism analysis in the LAMA1 gene in the Japanese patients with high myopia. *Clinical Ophthalmol* 1(3): 289-295, 2007.
 11. Yamane T, Mok J, Oka A, Okada E, Nishizaki R, Yonemoto J, Ohno S, Inoko H, Mizuki N: An association study for high myopia around the MYP2 locus on chromosome 18 using microsatellite markers in Japanese population. *Clinical Ophthalmol* 1(3): 305-309, 2007.
 12. Horie Y, Kitaichi N, Takemoto Y, Namba K, Yoshida K, Hirose S, Hasumi Y, Ota M, Inoko H, Mizuki N, Ohno S: Polymorphism of IFN-g gene and Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Mol Vis*, in press.
 13. Meguro A, Ota M, Katsuyama Y, Oka A, Teshigawara T, Ohno S, Inoko H, Mizuki N: Association of the Toll-like receptor 4 gene polymorphisms with Behcet' s disease. *Ann Rheum Dis*, in press.
 14. Asukata Y, Ishihara M, Hasumi Y, Nakamura S, Hayashi K, Mochizuki M, Ohno S, Mizuki N: Guideline for the diagnosis of ocular sarcoidosis. *Am J Ophthalmol*, in press.
 15. Hayashi T, Ishioka M, Ito N, Kato Y, Nakagawa H, Hatano H, Mizuki N: Bilateral herpes simplex keratitis in a patient with chronic graft-versus-host disease. *Clinical Ophthalmol* in press.
- H. 知的財産権の出願, 登録状況
特記事項なし

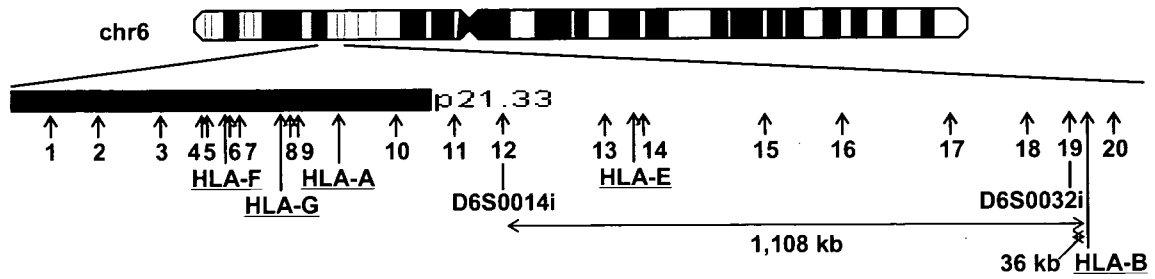


図1A 本研究で解析された20個のマイクロサテライト (MS) と5個の HLA 遺伝子

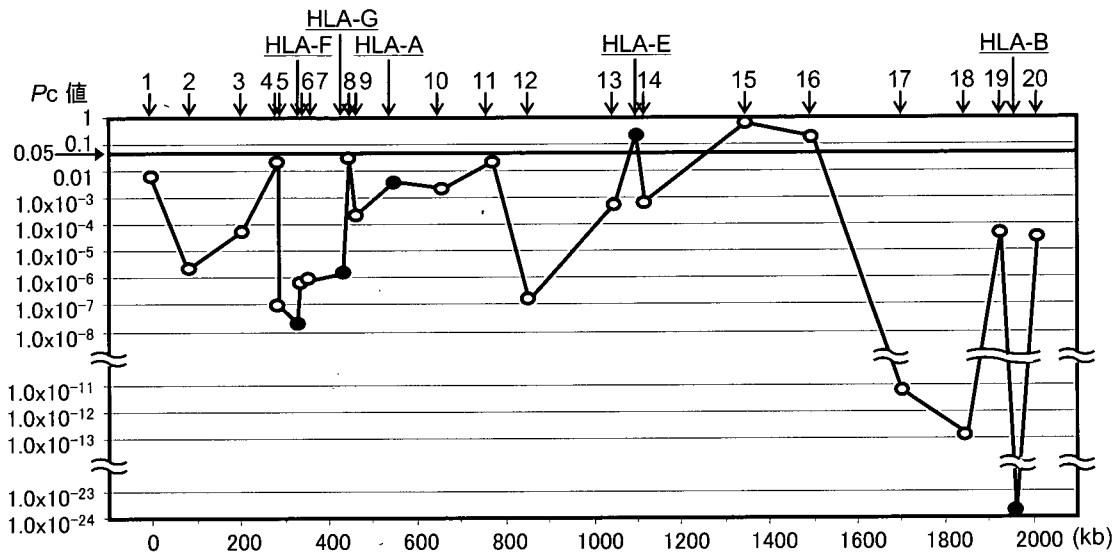


図1B 20個のMSと5個のHLA遺伝子のベーチェット病との相関

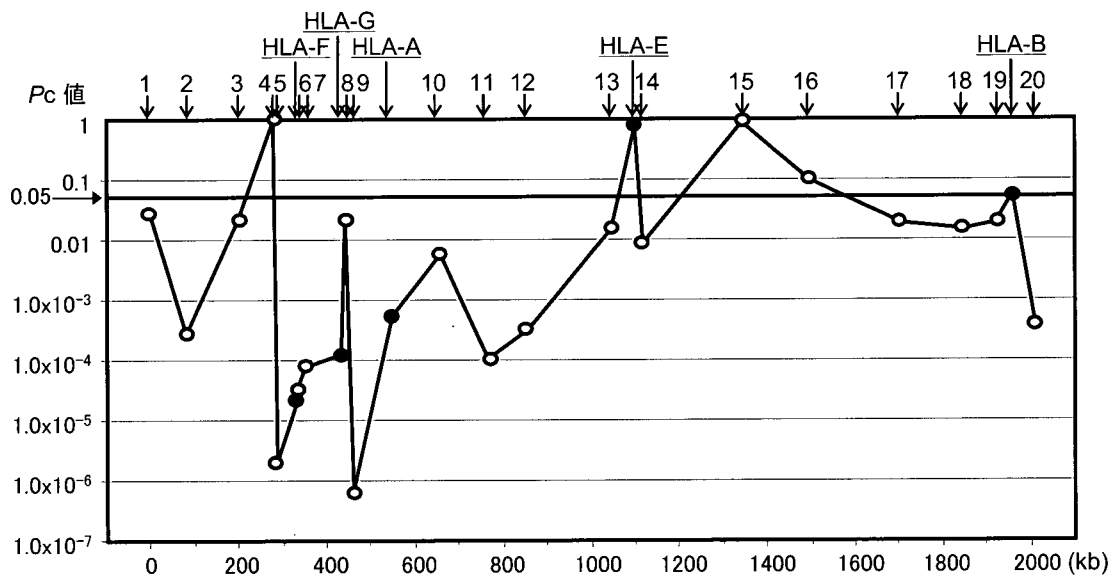


図1C 20個のMSと5個のHLA遺伝子のHLA-B*5101陰性ベーチェット病との相関

表1 HLA-A, -F, -G アリルのハプロタイプ頻度

| ハプロタイプ | 頻度 | | オッズ比 (95%CI) | P | Pc |
|--------------------------|-------|-------|-------------------|-----------------------|-----------------------|
| | 患者 | 健常者 | | | |
| A*0201-F*010101-G*010101 | 0.104 | 0.085 | 1.25 (0.76-2.07) | | |
| A*0206-F*010101-G*010101 | 0.063 | 0.075 | 0.83 (0.46-1.50) | | |
| A*2601-F*010101-G*010102 | 0.174 | 0.073 | 2.68 (1.69-4.25) | 2.89x10 ⁻⁵ | 0.0013 |
| A*2602-F*010101-G*010102 | 0.048 | 0.014 | 3.62 (1.43-9.19) | 0.0071 | NS |
| A*2603-F*010101-G*010102 | 0.033 | 0.014 | 2.47 (0.91-6.70) | | |
| A*2402-F*010102-G*010401 | 0.070 | 0.146 | 0.44 (0.26-0.75) | 0.0017 | NS |
| A*3303-F*010102-G*010401 | 0.030 | 0.083 | 0.34 (0.16-0.73) | 0.0033 | NS |
| A*0201-F*010103-G*010101 | 0.026 | 0.006 | 4.48 (1.15-17.47) | 0.038 | NS |
| A*2402-F*010103-G*010401 | 0.256 | 0.244 | 1.07 (0.76-1.50) | | |
| A*26-F*010101-G*010102 | 0.256 | 0.100 | 3.08 (2.07-4.58) | 2.30x10 ⁻⁸ | 9.88x10 ⁻⁷ |

表2 HLA-A*26サブタイプのアリル頻度および表現型頻度

| アリル/ 表現型 | 全検体 | | | | | B*5101 陰性検体 | | | | |
|-------------|-------|-------|------|-----------------------|-----------------------|-------------|-------|------|-----------------------|-----------------------|
| | 頻度 | | オッズ比 | P | Pc | 頻度 | | オッズ比 | P | Pc |
| | 患者 | 健常者 | | | | 患者 | 健常者 | | | |
| アリル | | | | | | | | | | |
| A*2601 | 0.132 | 0.073 | 1.92 | 0.00084 | 0.016 | 0.178 | 0.076 | 2.61 | 2.84x10 ⁻⁵ | 0.00051 |
| A*2602 | 0.030 | 0.015 | | | | 0.048 | 0.014 | 3.63 | 0.0051 | NS |
| A*2603 | 0.035 | 0.020 | | | | 0.033 | 0.016 | | | |
| A*2605 | 0.003 | 0.000 | | | | 0.000 | 0.000 | | | |
| A*26 | 0.201 | 0.108 | 2.07 | 9.99x10 ⁻⁶ | 7.99x10 ⁻⁵ | 0.259 | 0.106 | 2.96 | 4.54x10 ⁻⁸ | 3.63x10 ⁻⁷ |
| 表現型 | | | | | | | | | | |
| A*2601 | 0.257 | 0.140 | 2.12 | 0.00047 | 0.0089 | 0.338 | 0.145 | 3.01 | 1.21x10 ⁻⁵ | 0.00022 |
| A*2602 | 0.060 | 0.030 | | | | 0.096 | 0.027 | 3.74 | 0.0048 | NS |
| A*2603 | 0.070 | 0.040 | | | | 0.066 | 0.031 | | | |
| A*2605 | 0.007 | 0.000 | | | | 0.000 | 0.000 | | | |
| A*26 | 0.380 | 0.197 | 2.50 | 9.76x10 ⁻⁷ | 7.81x10 ⁻⁶ | 0.485 | 0.196 | 3.86 | 4.00x10 ⁻⁹ | 3.20x10 ⁻⁸ |

ベーチェット病における TLR 遺伝子多型と疾患感受性解析

太田 正穂 (信州大学医学部法医学教室)
勝山 善彦 (信州大学付属病院薬剤部)
目黒 明 (横浜市立大学大学院視覚器病態学)
水木 信久 (横浜市立大学大学院視覚器病態学)
大野 重昭 (北海道大学医学部視覚器病学)
猪子 英俊 (東海大学分子生命科学遺伝情報部門)

研究要旨

再発性難治性の炎症疾患であるベーチェット病 (BD) は、疾患発症に内的遺伝要因として HLA-B51 抗原が顕著な相関を示すことが知られているが、本疾患発症には HLA-B51 以外の遺伝子関与の可能性も示唆されている。本年度は、ベーチェット病発症に関わる外的要因として考えられる病原体や微生物に対して認識システムを有する機能分子 Toll 様受容体 (Toll-like receptor :TLR) 遺伝子の多型性とベーチェット病疾患感受性との相関解析を行った。解析には 200 人の BD 患者 DNA と、102 人の健常人 DNA を用いた。疾患感受性解析に用いた TLR 遺伝子は TLR2, TLR4, TLR7, TLR9 であり、各遺伝子内外に局在する SNP (single nucleotide polymorphism) との相関解析を行った。TLR2 については 5 種類の SNPs, TLR4 については遺伝子内及び周辺に分布する 9 種類の SNPs, TLR7 には 10 種類の SNPs, TLR9 については 9 種類の SNPs を選出しタイピングを行った。タイピングは Real-Time PCR (ABI) を用いた TaqMan 解析により行い、得られた各群の対立遺伝子から χ^2 法による相関解析、および推定ハプロタイプによる連鎖不平衡解析を行った。解析結果から、TLR2 と TLR9 遺伝子の SNPs では疾患との相関は認められなかった。TLR4 では rs7037117 の A アリルと相関を示し (R.R. = 2.03, P = 0.0066, Pc = 0.059), TLR7 では女性群において rs5743733 が C/C で相関が見られた (R.R = 3.21, P = 0.01)。

本解析で相関を示した TLR 遺伝子内の SNP が免疫応答誘導に及ぼす機能的作用については、今後更なる検討が必要である。

A. 研究目的

ベーチェット病は急性の炎症を繰り返す原因不明の難治性疾患であり、発症要因は内的遺伝子因子と外的環境要因関わった複合性遺伝性疾患と考えられる。内的遺伝因子としては HLA-B51 対立遺伝子が発症要因の一因とされているが、疾患発症に関わる HLA-B51 遺伝子以外の遺伝子の検索が必要とされている。

本疾患の発症には外的環境要因として病原体や微生物の関与が示唆されている。病原体の生体侵入に対して、病原体の識別・排除は自然免疫と獲得免疫の免疫機構によりなされている。細菌やウ

イルスによる感染防御において、自然免疫担当細胞の活性化に主要な役割を果たす Toll-like receptor (TLR) には、いくつかの TLR ファミリーがあり、その特定のメンバーはウイルスや細菌の構成成分を認識することが明らかになっている。11 種類報告されている TLR で、TLR2 と TLR5 は細菌感染で機能を果たしており、TLR2 はペプチドグリカンやリポプロテインを認識し、TLR5 はフラジェリンを認識している。TLR4 と TLR9 は細菌・ウイルス両感染機構で機能を果たしており、TLR4 は細菌の LPS (lipopolysaccharide) やウイルスの F protein (RSV) や envelope protein (MMTV) を認識していることが報告されている。また、

TLR9は細菌やウイルスに存在する CpG DNA を認識することが明らかにされている。TLR3とTLR7はウイルス認識に関わっており、TLR3はウイルスが宿主細胞に感染し複製する際に生ずる dsRNA の認識し、TLR7はイミダキノリン誘導体や、ウイルスの一本鎖 RNA (ssRNA) を認識することが明らかにされている。

本年度は、これら TLR ファミリーの機能を考慮し、各 TLR (TLR2, TLR4, TLR7, TLR9) の遺伝子多型がベーチェット病との疾患感受性に相関を示すか解析を試みた。

B. 研究方法

① 横浜市立大学附属病院眼科または北海道大学附属病院眼科にて、ベーチェット病と診断された患者さん200人の DNA と健常人102人の DNA を用いた。解析にあたり、使用する DNA は、提供者から文書による同意を得た後行った。また、これらの解析は各大学での倫理審査委員会で承認を得たものである。

② 解析に用いた TLR 内 SNPs と型判定

今回解析に用いた SNPs は、TLR2では5箇所、TLR4では9箇所、TLR7では10箇所、TLR9では10箇所に設定した。(表1-4)。

SNPs の遺伝子型判定は、ABI TaqMan SNP genotyping assay kit を用い、TaqMan Real Time PCR (7500 Real Time PCR System, ABI) で行った。

C. 研究結果と考察

① TLR2遺伝子内の各 SNPs について、ベーチェット病疾患感受性の相関を χ^2 検定で解析したが、いずれの SNPs においても有意差を示すものは見られなかった(表1)。

② TLR4遺伝子内の9箇所の SNPs における疾患感受性の相関は、3'UTR 領域にある rs7037117 の A アリルと有意な相関を示した (R.R. = 2.03, P = 0.0066, Pc = 0.059) (表2)。

③ TLR7遺伝子では、性別を考慮しないと何れの SNPs でも有意な相関は見られなかったが、性別群で解析すると、女性群において intron 2

領域内にある rs5743733 が C/C homozygote の時に相関を示した (R.R. = 3.21, P = 0.0099, Pc = 0.079) (表3)。

④ TLR9遺伝子内の SNPs では、いずれの SNPs においても有意差を示すものは見られなかった(表4)。

⑤ Clark アルゴリズムからハプロタイプを推定するソフトウェアを用いて9種類の SNPs より患者群とコントロール群におけるハプロタイプ頻度を推定し、両群の頻度について χ^2 検定を行ったところ図1に示すように、CGATTGTGA ハプロタイプで有意差を確認した (P < 0.05)。

TLR はウイルスや細菌のリガンドを認識すると、炎症性サイトカインやケモカインを誘導し炎症反応を形成することが知られている。また、炎症性サイトカイン以外にも I 型 IFN を誘導することも知られている。特に TLR ファミリーのなかでも TLR3, TLR4, TLR7, TLR9 は I 型 IFN を誘導することが可能である。このように TLR 分子の機能を見ると、ベーチェット病との関わりの可能性が示唆される。今回調べた TLR の遺伝子内多型と疾患感受性では、TLR4 と TLR7 に統計学的に有意な相関が観察されたが、これらの相関を示した SNP については今後更なる検討が必要である。

D. 健康危険情報

特記事項なし

E. 論文発表

1. Ota M, Fukushima H, Kulski JH, Inoko H. Single nucleotide polymorphism detection by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Nature Protocols*. 2:2857-2864, 2007.
2. Horie Y, KItaichi N, Takemoto Y, Namba K, Yoshida K, Hirose S, Hasumi Y, Ota M, Inoko H, Mizuki N, Ohno S. Polymorphism of *IFN-g* gene and Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Molecular Vision*. 13:2334-2338, 2007.
3. Ito A, Ota M, Katsuyama Y, Inoko H, Ohno S, Mizuki N. Lack of association of Toll-like receptor 9.
4. polymorphism with Behcet's disease in Japanese

patients. *Tissue Antigens*. 70:423-426, 2007.

5. Katsuyama Y, Ota M, Mizuki N, Ito A, Okada E, Ohno S, Matsunaga T, Fukushima H, Ohmori S. MDR1 polymorphisms effect cyclosporine AUC0-4 values in Becht's disease patients. *Clinical Ophthalmology*. 1:297-303, 2007.
6. Sasaki S, Ota M, Meguro A, Nishizaki R, Okada E, Mok J, Kimura T, Oka A, Katsuyam Y, Ohno S, Inoko H, Mizkuki N. A single nucleotide polymorphism analysis of the LAMA1 gene in

Japanese patients with high myopia. *Clinical Ophthalmology*, 1:289-295, 2007.

7. Inamori Y, Ota M, Inoko H, Okada E, Nishizaki R, Shiota T, Mok J, Oka A, Ohno S, Mizuki N. The COL1A1 gene and high myopia susceptibility in Japanese. *Hum Genet*. 122:151-157, 2007.

G. 知的財産権の出願・特許状況

なし

表1 TLR2 遺伝子内 SNPs との相関

| Name | dbSNP | Gene Location | AA change | Allele | Case | Control | χ^2 | P |
|------|------------|---------------|------------|--------|-----------|-----------|----------|----|
| SNP1 | rs1898830 | Intron 1 | | A | 161(80.5) | 100(78.1) | 0.271 | NS |
| | | | | G | 141(70.5) | 94(73.4) | 0.332 | NS |
| SNP2 | rs11938228 | Intron 2 | | A | 142(71.0) | 92(71.9) | 0.029 | NS |
| | | | | C | 163(81.5) | 101(78.9) | 0.334 | NS |
| SNP3 | rs3804099 | Exon 3 | synonymous | C | 98(49.0) | 63(49.2) | 0.001 | NS |
| | | | | T | 180(90.0) | 120(93.8) | 1.406 | NS |
| SNP4 | rs3804100 | Exon 3 | synonymous | C | 96(48.0) | 57(44.5) | 0.539 | NS |
| | | | | T | 181(90.5) | 122(95.3) | 0.109 | NS |
| SNP5 | rs7656411 | 3' near gene | | G | 163(81.5) | 105(82.0) | 0.557 | NS |
| | | | | T | 139(69.5) | 85(66.4) | 0.903 | NS |

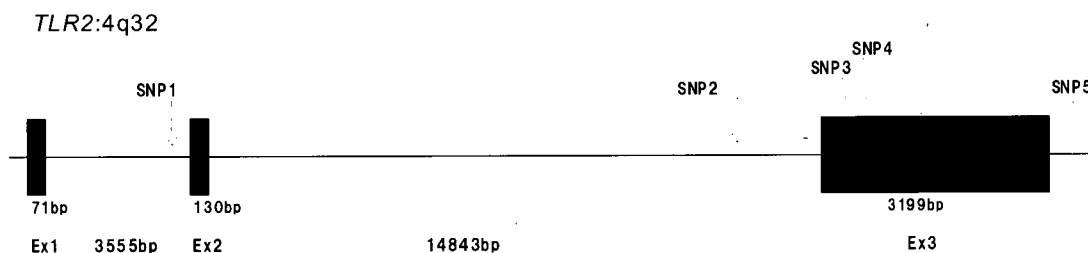


表2 TLR4 遺伝子内 SNPs との相関

| dbSNP | Allele/genotype | BD | | NC | | O.R. | 95%CI | | χ^2 | P-value |
|-------|-----------------|-------|------|-------|------|------|-------|------|----------|---------|
| | | n=200 | % | n=102 | % | | | | | |
| SNP1 | T | 239 | 59.8 | 138 | 67.6 | 0.71 | 0.50 | 1.01 | 3.59 | 0.0624 |
| | C | 161 | 40.3 | 66 | 32.4 | 1.41 | 0.88 | 2.25 | 3.59 | 0.0624 |
| | T/T | 68 | 34.0 | 48 | 47.1 | 0.58 | 0.36 | 0.94 | 4.87 | 0.0334 |
| | T/C | 103 | 51.5 | 42 | 41.2 | 1.52 | 0.94 | 2.46 | 2.88 | 0.1132 |
| | C/C | 29 | 14.5 | 12 | 11.8 | 1.27 | 0.62 | 2.61 | 0.43 | 0.5960 |
| SNP2 | A | 240 | 60.0 | 138 | 67.6 | 0.72 | 0.50 | 1.02 | 3.37 | 0.0753 |
| | G | 160 | 40.0 | 66 | 32.4 | 1.39 | 0.87 | 2.23 | 3.37 | 0.0753 |
| | A/A | 68 | 34.0 | 48 | 47.1 | 0.58 | 0.36 | 0.94 | 4.87 | 0.0334 |
| | A/G | 104 | 52.0 | 42 | 41.2 | 1.55 | 0.96 | 2.51 | 3.17 | 0.0884 |
| | G/G | 28 | 14.0 | 12 | 11.8 | 1.22 | 0.59 | 2.51 | 0.29 | 0.5989 |
| SNP3 | G | 248 | 62.0 | 137 | 67.2 | 0.80 | 0.56 | 1.14 | 1.55 | 0.2447 |
| | A | 152 | 38.0 | 67 | 32.8 | 1.25 | 0.79 | 1.99 | 1.55 | 0.2447 |
| | G/G | 73 | 36.5 | 49 | 48.0 | 0.62 | 0.38 | 1.01 | 3.74 | 0.0630 |
| | G/A | 102 | 51.0 | 39 | 38.2 | 1.68 | 1.03 | 2.73 | 4.42 | 0.0387 |
| | A/A | 25 | 12.5 | 14 | 13.7 | 0.90 | 0.45 | 1.82 | 0.09 | 0.8562 |
| SNP4 | C | 246 | 61.5 | 139 | 68.1 | 0.75 | 0.52 | 1.07 | 2.58 | 0.1281 |
| | T | 154 | 38.5 | 65 | 31.9 | 1.34 | 0.84 | 2.13 | 2.58 | 0.1281 |
| | C/C | 72 | 36.0 | 49 | 48.0 | 0.61 | 0.38 | 0.99 | 4.07 | 0.0477 |
| | C/T | 102 | 51.0 | 41 | 40.2 | 1.55 | 0.96 | 2.51 | 3.16 | 0.0882 |
| | T/T | 26 | 13.0 | 12 | 11.8 | 1.12 | 0.54 | 2.32 | 0.09 | 0.8554 |
| SNP5 | G | 248 | 62.0 | 139 | 68.1 | 0.76 | 0.53 | 1.09 | 2.21 | 0.1516 |
| | T | 152 | 38.0 | 65 | 31.9 | 1.31 | 0.82 | 2.08 | 2.21 | 0.1516 |
| | G/G | 73 | 36.5 | 49 | 48.0 | 0.62 | 0.38 | 1.01 | 3.74 | 0.0630 |
| | G/T | 102 | 51.0 | 41 | 40.2 | 1.55 | 0.96 | 2.51 | 3.16 | 0.0882 |
| | T/T | 25 | 12.5 | 12 | 11.8 | 1.07 | 0.51 | 2.23 | 0.03 | 1.0000 |
| SNP6 | G | 316 | 79.0 | 151 | 74.0 | 1.32 | 0.89 | 1.96 | 1.91 | 0.1821 |
| | C | 84 | 21.0 | 53 | 26.0 | 0.76 | 0.48 | 1.21 | 1.91 | 0.1821 |
| | G/G | 121 | 60.5 | 57 | 55.9 | 1.21 | 0.75 | 1.96 | 0.60 | 0.4599 |
| | G/C | 74 | 37.0 | 37 | 36.3 | 1.03 | 0.63 | 1.69 | 0.02 | 1.0000 |
| | C/C | 5 | 2.5 | 8 | 7.8 | 0.30 | 0.10 | 0.94 | 4.68 | 0.0384 |
| SNP7 | T | 352 | 88.0 | 184 | 90.2 | 0.80 | 0.46 | 1.38 | 0.65 | 0.4966 |
| | C | 48 | 12.0 | 20 | 9.8 | 1.25 | 0.70 | 2.26 | 0.65 | 0.4966 |
| | T/T | 153 | 76.5 | 82 | 80.4 | 0.79 | 0.44 | 1.42 | 0.59 | 0.4680 |
| | T/C | 46 | 23.0 | 20 | 19.6 | 1.22 | 0.68 | 2.20 | 0.46 | 0.5575 |
| | C/C | 1 | 0.5 | 0 | 0.0 | - | - | - | 0.51 | 1.0000 |
| SNP8 | A | 304 | 76.0 | 172 | 84.3 | 0.59 | 0.38 | 0.92 | 5.59 | 0.0204 |
| | G | 96 | 24.0 | 32 | 15.7 | 1.70 | 1.03 | 2.79 | 5.59 | 0.0204 |
| | A/A | 113 | 56.5 | 74 | 72.5 | 0.49 | 0.29 | 0.82 | 7.38 | 0.0083 |
| | A/G | 78 | 39.0 | 24 | 23.5 | 2.08 | 1.21 | 3.56 | 7.23 | 0.0099 |
| | G/G | 9 | 4.5 | 4 | 3.9 | 1.15 | 0.35 | 3.83 | 0.05 | 1.0000 |
| SNP9 | A | 362 | 90.5 | 189 | 92.6 | 0.76 | 0.41 | 1.41 | 0.78 | 0.8234 |
| | G | 38 | 9.5 | 15 | 7.4 | 1.32 | 0.69 | 2.54 | 0.78 | 0.8234 |
| | A/A | 163 | 81.5 | 87 | 85.3 | 0.76 | 0.40 | 1.46 | 0.68 | 0.4269 |
| | A/G | 36 | 18.0 | 15 | 14.7 | 1.27 | 0.66 | 2.45 | 0.52 | 0.5191 |
| | G/G | 1 | 0.5 | 0 | 0.0 | - | - | - | 0.51 | 1.0000 |

図1 TLR4 遺伝子内 SNP のハプロタイプ構造と頻度

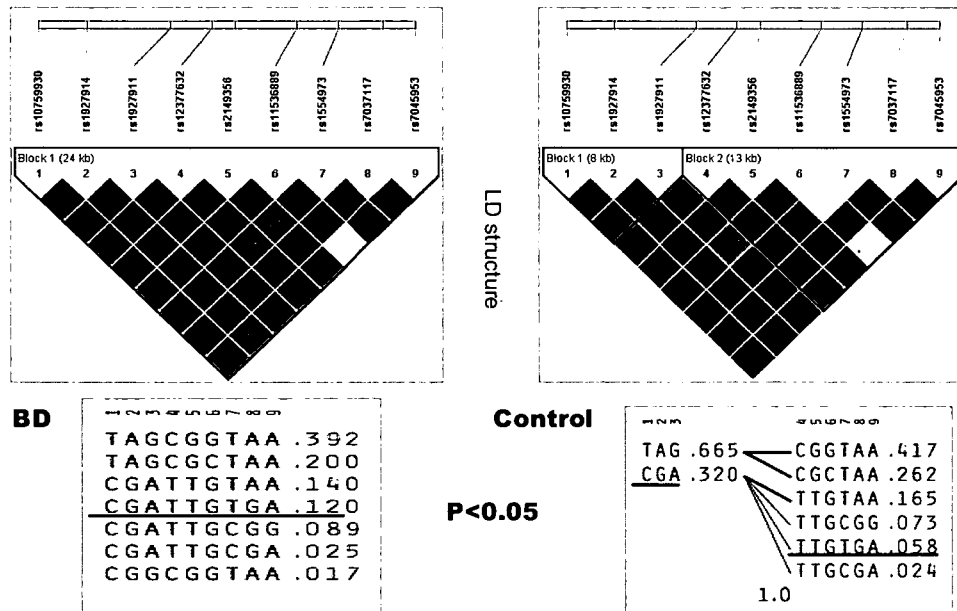


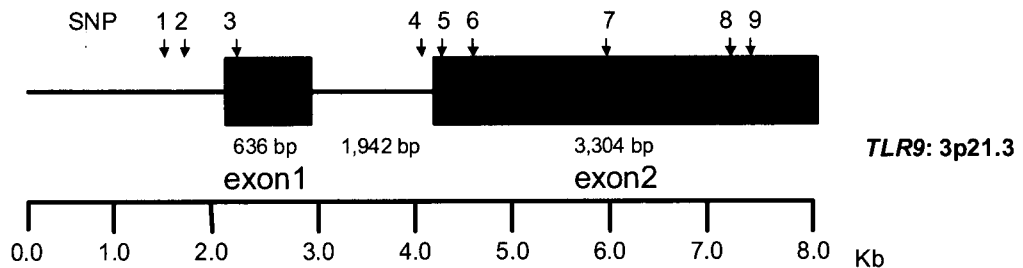
表3 TLR7 遺伝子内 SNPs との相関

| dbSNP | Name | BD | | | | control | | | | R.R. | η^2 | P | BD | | | | R.R. | χ^2 |
|-----------|-------|-----|----|----|----|---------|------|------|--------|------|----------|---|-----|-----|----|----|------|----------|
| | | + | - | + | - | + | - | + | - | | | | + | - | + | - | | |
| rs5935436 | SNP1 | C | 84 | 0 | 53 | 1 | | | | | | | 115 | 1 | 48 | 0 | | |
| | | T | 5 | 79 | 8 | 46 | | | | | | | 1 | 115 | 0 | 48 | | |
| rs5741880 | SNP2 | G | 84 | 0 | 53 | 1 | | | | | | | 115 | 1 | 48 | 0 | | |
| | | T | 5 | 79 | 8 | 46 | | | | | | | 1 | 115 | 0 | 48 | | |
| rs5743733 | SNP3 | C | 82 | 2 | 53 | 1 | | | | | | | 108 | 8 | 48 | 0 | | |
| | | G | 9 | 75 | 15 | 39 | 0.31 | 6.66 | 0.0099 | | | | 8 | 108 | 0 | 48 | | |
| | | C/C | 75 | 9 | 39 | 15 | 3.21 | 6.66 | 0.0099 | | | | | | | | | |
| | | C/G | 7 | 77 | 14 | 40 | 0.26 | 7.89 | 0.0050 | | | | | | | | | |
| rs5743740 | SNP4 | A | 84 | 0 | 52 | 2 | | | | | | | 98 | 18 | 42 | 6 | | |
| | | G | 23 | 61 | 15 | 39 | | | | | | | 18 | 98 | 6 | 42 | | |
| rs179016 | SNP5 | G | 84 | 0 | 52 | 2 | | | | | | | 98 | 18 | 42 | 6 | | |
| | | C | 23 | 61 | 16 | 38 | | | | | | | 18 | 98 | 6 | 42 | | |
| rs1620233 | SNP6 | C | 84 | 0 | 54 | 0 | | | | | | | 110 | 6 | 47 | 1 | | |
| | | T | 9 | 75 | 3 | 51 | | | | | | | 6 | 110 | 1 | 47 | | |
| rs179012 | SNP7 | G | 84 | 0 | 53 | 1 | | | | | | | 103 | 13 | 41 | 7 | | |
| | | A | 16 | 68 | 14 | 40 | | | | | | | 13 | 103 | 7 | 41 | | |
| rs3853839 | SNP10 | G | 39 | 45 | 22 | 32 | | | | | | | 28 | 88 | 21 | 27 | 0.41 | 6.23 |
| | | A | 81 | 3 | 49 | 5 | | | | | | | 88 | 28 | 27 | 21 | 2.44 | 6.23 |

TLR7: Xp22.3

表4 TLR9 遺伝子内 SNPs との相関

| Name | SNP rs | Function | AA change | Allele | Case | Control | χ^2 | P |
|------|-----------|----------------|------------|--------|-----------|----------|----------|----|
| SNP1 | rs187084 | 5'Untranslated | | A | 141(70.5) | 75(73.5) | 0.304 | NS |
| | | | | G | 151(75.5) | 73(71.6) | 0.545 | |
| SNP2 | rs5743836 | 5'Untranslated | | T | 200(100) | 102(100) | | NS |
| | | | | C | 0(0) | 3(2.9) | | |
| SNP3 | rs5743841 | Exon1 | synonymous | C | 200(100) | 102(100) | | NS |
| | | | | T | 0(0) | 0(0) | | |
| SNP4 | rs352139 | Intron1 | | T | 141(70.5) | 76(74.5) | 0.537 | NS |
| | | | | C | 150(75.0) | 72(70.6) | 0.675 | |
| SNP5 | rs5743842 | Exon2 | Arg to Cys | C | 200(100) | 102(100) | | NS |
| | | | | T | 0(0) | 0(0) | | |
| SNP6 | rs5743843 | Exon2 | Gln to His | C | 200(100) | 102(100) | | NS |
| | | | | A | 0(0) | 0(0) | | |
| SNP7 | rs352140 | Exon2 | synonymous | T | 150(75) | 71(69.6) | 1.001 | NS |
| | | | | C | 109(54.5) | 55(53.9) | 0.009 | |
| SNP8 | rs5743845 | Exon2 | Arg to Gln | C | 200(100) | 102(100) | | NS |
| | | | | T | 1(0.5) | 3(2.9) | | |
| SNP9 | rs5743846 | Exon2 | Ala to Thr | C | 100 | 100 | | NS |
| | | | | T | 0 | 0 | | |



韓国人ベーチェット病における HLA-B51 遺伝子の検討

分担研究者 大野 重昭 (北海道大学大学院医学研究科眼科学分野)
研究協力者 堀江 幸弘 (北海道大学大学院医学研究科眼科学分野)
竹本 裕子 (北海道大学大学院医学研究科眼科学分野)
目黒 明 (横浜市立大学大学院医学研究科視覚器病態学)
太田 正穂 (信州大学医学部法医学)

Yeong-Wook Song (Department of Internal Medicine and Graduate Program in Immunology, Director, National Research Laboratory of Rheumatic Diseases, Seoul National University Hospital, Seoul, Korea)

Kyung Sook Park (Department of Biology, Dean, College of Natural Sciences, Sungshin Women's University, Seoul, Korea)

猪子 英俊 (東海大学医学部基礎医学系分子生命科学)

水木 信久 (横浜市立大学大学院医学研究科視覚器病態学)

研究要旨

ベーチェット病は HLA-B51 と強い相関を示すことが知られている。今回我々は韓国のベーチェット病患者を対象に HLA-B タイピングを行なったので、その結果を報告する。

対象は韓国のソウル国立医科大学内科でベーチェット病と診断されたベーチェット患者110例 (男性56例, 女性54例) と健常対照者111例の合計221検体である。

その結果、従来の報告と同様に、HLA-B*51 が韓国人ベーチェット病患者でも有意の高頻度を示した (遺伝子型頻度: 相対危険度2.68, $P = 0.0002$, 表現型頻度: 相対危険度2.80, $P = 0.0065$)。また眼症状を有する患者群44例と眼症状を有しない患者群66例で HLA-B の頻度を比較したところ、眼症状を有する群で HLA-B*51 の遺伝子型頻度が有意に高くみられた (相対危険度2.00, $P = 0.029$)。

以上より、韓国人ベーチェット病患者では日本と同様に HLA-B*51 が有意に高く、特に眼症状を有する患者群での保有率が高いとことがわかった。

A. 研究目的

ダイレクトシーケンス法により韓国人ベーチェット病 (BD) 患者の HLA-B 遺伝子のアレルタイピングを行い、韓国における BD 患者と健常対照者とのアレル保有率を比較検討した。さらに BD 患者群で眼症状の有無によるアレル保有率の比較を行なったので報告する。

B. 研究方法

【対象】

対象は韓国ソウル国立医科大学内科で BD と診断された BD 患者110例 (男性56例, 女性54例) と健常対照者111例の合計221検体である。

【方法】

末梢血から抽出した DNA を用いて、市販の HLA タイピングキット (AlleleSEQR HLA-B Typing Kit (Abbott Japan)) を用い、HLA-B 遺伝子の exon2, 3, 4 を PCR 法により増幅した後、ダイレクトシーケンスを行なった。

(倫理面への配慮)

本病患者および健常対照者一人一人に対し、本研究の主旨を説明し、遺伝子解析を行な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

HLA-B の遺伝子型頻度は、HLA-B*51がBD患者では23.6%、健常対照者では10.4%、相対危険度2.68、 $P = 0.00020$ となりBD患者で有意に多く見られた。4桁アレルタイピングの結果はB*51のうちB*5101とB*5102がそれぞれ50例、2例であった。表現型頻度でもBD患者では40.9%、健常対照者では19.8%、相対危険度2.80、 $P = 0.00065$ となり、やはりB*51でのみ有意差がみられた。

次にBD患者において、眼症状を有する44例と眼症状を有しない66例に分けて遺伝子頻度を比較した。その結果、眼症状を有する群ではHLA-B*51とB*52が有意に多くみられた。また、B*51は眼症状を有する群では31.8%、有しない群では18.9%、相対危険度2.00、 $P = 0.029$ であった。これに対し、B*52は眼症状を有する群では3.4%、有しない群では0.0%、 $P = 0.033$ であった。同じ対象で表現型頻度を比較したが、有意差は見られなかった。

D. 考 察

日本人BD患者に占めるHLA-B*51保有率は約60%程度とされているが、今回の韓国人BD患者では40.9%であった。この違いの一因として、今回のBD患者サンプルは眼科ではなく内科で集められたということと関係しているかもしれない。というのは、今回の結果から明らかになったように眼症状を有する患者群ではHLA-B*51遺伝子が有意に多く見られた(遺伝子頻度)からである。

しかし、保有率という点で見た場合(表現型頻度)、眼症状を有する群と有しない群では有意差が見られなかったことからはっきりとした断定は出来ない。この点については今後患者数を増やすなどしてさらに検討する必要がある。

今回の我々の結果から、韓国においてもHLA-B*51遺伝子はベーチェット病の発症と深く関係していた。さらにB*51がホモである場合には、眼症状の出現頻度が有意に高いことが示唆された。

E. 結 論

韓国人BD患者でもHLA-B*51が有意に高く見られ、特に眼症状を有する患者群での保有率が高いことが明らかにされた。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

病因・病態と発症外因子

ベーチェット病における HO-1 発現低下と TLR 発現異常

分担研究者 石ヶ坪良明 (横浜市立大学病態免疫制御内科)
共同研究者 桐野 洋平 (横浜市立大学病態免疫制御内科)
渡邊 玲光 (横浜市立大学病態免疫制御内科)
宮崎 拓也 (横浜市立大学病態免疫制御内科)
村上 修司 (横浜市立大学病態免疫制御内科)
小林 正芳 (横浜市立大学病態免疫制御内科)
岳野 光洋 (横浜市立大学病態免疫制御内科)
水木 信久 (横浜市立大学眼科)

研究要旨

ベーチェット病 (BD) における Toll-like receptor (TLR) と抗炎症蛋白 heme oxygenase (HO)-1 の発現との関連, 病態への関与を検討するため, 末梢血単核細胞 (PBMC), 多核白血球 (PMN) より mRNA を抽出し, real-time PCR 法を用いて TLR-2,4 および HO-1 mRNA を半定量的に解析した。また, PBMC を TLR4 リガンドの LPS/HSP60 で刺激し, HO-1 蛋白の発現を Western 法で解析した。さらに, 単球に HO-1 発現ベクターを導入し, サイトカイン産生および TLR の発現を解析した。

その結果, HO-1 mRNA 発現は PBMC では活動期に健常コントロールに比較して低下し, TLR4 mRNA 発現は疾患活動性を問わず PBMC, PMN で亢進していた。LPS 刺激による PBMC の HO-1 発現量と TLR4 発現量は逆相関を示し, HO-1 発現量と炎症性サイトカイン産生についても逆相関を示した。以上の結果より, BD 白血球では HO-1 発現低下が炎症惹起に作用し, その要因の一つに TLR4 発現亢進が関与している可能性がある。

A. 研究目的

ベーチェット病では自己免疫疾患としての側面, 特に, 病原微生物からヒトまで抗原性が高く保存されている熱ショック蛋白 (heat shock protein 60; HSP60) の交差反応を介した自己免疫機序が注目されてきたが, 近年, 自然免疫系の活性化に病態の主座を置く自己炎症性症候群 (autoinflammatory syndrome) としての側面にも興味が広がっている。HSP を含め, 病原微生物の構成成分が Toll-like receptor (TLR) を介して自然免疫系を活性化することが解明され, ベーチェット病においてもその関与が検討されている。しかしながら, まだ仮説の段階であり, 十分明らかでない。

私どもはベーチェット病をはじめとした炎症性疾患において, 抗炎症作用を有する heme oxygenase-1 (HO-1) について研究を進めている。

本研究では, 自然免疫系の活性化に関わる TLR と炎症の制御系にかかわる HO-1 について, ベーチェット病患者白血球を用いて検討した。

B. 研究方法

1. 対象: 厚生労働省ベーチェット病診断基準 (1987年) を満たす患者33例 (男13例, 女20例, 平均年齢 47.7 ± 15.0 才)。活動期13例, 非活動期20例。眼病変17例, 神経型3例, 腸管型2例, 血管型2例。治療はコルヒチン, サイクロスポリン, プレドニゾロン他を服用していた。健常者30名をコントロールとした。

(倫理面への配慮)

すべての血液供給者に対し, 研究の目的, 使用方法を説明し, 文書にて同意を得た上で採血を行

なった。

2. 白血球の mRNA 発現解析：末梢血より二重フィコール分離法を用いて末梢血単核細胞 (PBMC)、多核白血球 (PMN) を分離し、AGPC 法により RNA を抽出した。HO-1、TLR2、TLR4 の mRNA は TaqMan の real-time PCR 法にて解析した。各 mRNA の発現量は、内因性コントロールの GAPDH で補正し、arbitrary unit で定量化した。
3. HO-1 蛋白発現解析：分離直後あるいは LPS 刺激後の PBMC より蛋白を抽出し、抗 HO-1 抗体を用いた免疫ブロッティング法により半定量的に解析した。

C. 研究結果

1. ベーチェット病患者白血球における HO-1 mRNA の発現

ベーチェット病患者 PBMC の HO-1 mRNA 発現量は活動期に、PMN においては疾患活動性に関係なく、健常者に比較し有意に低下していた。この HO-1 の低下と病型、治療薬に関連は見出せなかった (表 1, 2)。

2. ベーチェット病患者白血球における TLR mRNA の発現

TLR2 については PBMC、PMN ともに患者、健常者では差異はなかった。TLR4 は患者 PBMC で疾患活動性に関わらず亢進し、PMN でも同様の傾向がみられた (表 3)。

3. HO-1 と TLR4 の mRNA 量発現の関連

HO-1 の発現と TLR 発現の関連を検討したところ、PBMC において、TLR4 と HO-1 の mRNA 発現量は負の相関にあった。HO-1 と他の TLR の発現量には相関はなかった。

4. TLR4 と HO-1 の相互への影響

以上の成績より、ベーチェット病患者白血球における TLR4 の過剰発現が、HO-1 の発現低下に関与している可能性が考えられ、PBMC を TLR4 のリガンドである LPS で刺激し、HO-1 蛋白の発現量を検討した。LPS 刺激により HO-1 蛋白の減少を認め、さらに、患者 PBMC において TLR4 の発現量と LPS 刺激による HO-1 の発現量の間には負の相関がみられた。

HO-1 発現ベクターをヒト単球にトランスフェクトし、HO-1 を過剰発現させ、TLR2、TLR4 の発現に対する影響を検討したところ、いずれもコントロールと差異を認めなかった。

D. 考 察

HO-1 の抗炎症作用については多数の報告がある。HO-1 遺伝子治療や誘導療法は種々の炎症性疾患を軽減する一方、HO-1 欠損児や HO-1 ノックアウトマウスでは激しい炎症が観察されている。本研究でも HO-1 発現ベクターを用いた実験から、HO-1 の発現量と炎症性サイトカインの産生量には負の相関があることを認めており、HO-1 の抗炎症作用の一端が検証された。

本研究結果から、ベーチェット病患者では特に活動期に白血球における HO-1 の発現低下が認められ、HO-1 による炎症制御不全がベーチェット病の病態形成に関与している可能性が示唆された。さらに、TLR の解析結果では、ベーチェット病患者白血球に TLR4 発現亢進を認め、TLR4 リガンドである LPS 刺激により、TLR4 の発現量に依存して HO-1 発現は低下した。以上の成績より、ベーチェット病では恒常的に TLR4 の発現亢進があり、活動期に何らかの TLR4 リガンドが作用し、HO-1 発現を低下させ、炎症制御不全のさらなる悪化を来たすものと考えられた。したがって、HO-1 発現低下を是正する手段はベーチェット病における炎症を制御する治療手段に応用できる可能性がある。

今後、以上の知見が近年、自己炎症症候群において注目されている inflammasome の機能制御とどう関連するかを検討する予定である。

E. 結 論

ベーチェット病白血球では TLR4 発現が亢進し、HO-1 の発現低下を招き、炎症病態を促進させる。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kirino Y, Takeno M, Murakami S, Kobayashi M, Kobayashi H, Miura K, Ideguchi H, Ohno S, Ueda A, Ishigatsubo Y, Tumor necrosis factor- α acceleration of inflammatory responses by down regulating heme oxygenase-1 in human peripheral monocytes. *Arthritis Rheum.* 56: 464-475, 2007.

2. 学会発表

1. 桐野洋平, 岳野光洋, 村上修司, 小林正芳, 上田敦久, 石ヶ坪良明. ベーチェット病における heme oxygenase-1発現低下と Toll-like receptor 発現異常. 第51回日本リウマチ学会, 横浜, 2007年4月.
2. 桐野洋平, 岳野光洋, 渡邊玲光, 村上修司, 小林正芳, 出口治子, 大野 滋, 上田敦久, 蓮見由紀子, 水木信久, 石ヶ坪良明. Infliximab による関節リウマチ患者 PBMC の heme oxy-

genase-1上昇とその意義. 第51回日本リウマチ学会, 横浜, 2007年4月.

3. Kirino Y, Takeno M, Murakami S, Ideguchi H, Ohno S, Ueda A, Ishigatsubo Y. Down Regulation of Heme Oxygenase 1 by Tumor Necrosis Factor and Lipopolysaccharide Amplify Inflammatory Responses in Human Peripheral Monocytes, ACR, Boston, 2007, Nov.
4. Kirino Y, Takeno M, Murakami S, Watanabe R, Kobayashi M, Ideguchi H, Ihata A, Ohno S, Ueda A, Mizuki N, Ishigatsubo Y. Down Excessive Expression of Toll-like Receptor 4 Associated with Down-regulation of Heme Oxygenase 1 Accelerates Inflammatory Responses in Behçet's Disease, ACR, Boston, 2007, Nov.

H. 知的財産権の出願, 登録状況

特になし

図1 ベーチェット病 (BD) 患者及び健常人 PBMC における HO-1 mRNA 発現 $P < 0.05$ vs healthy controls

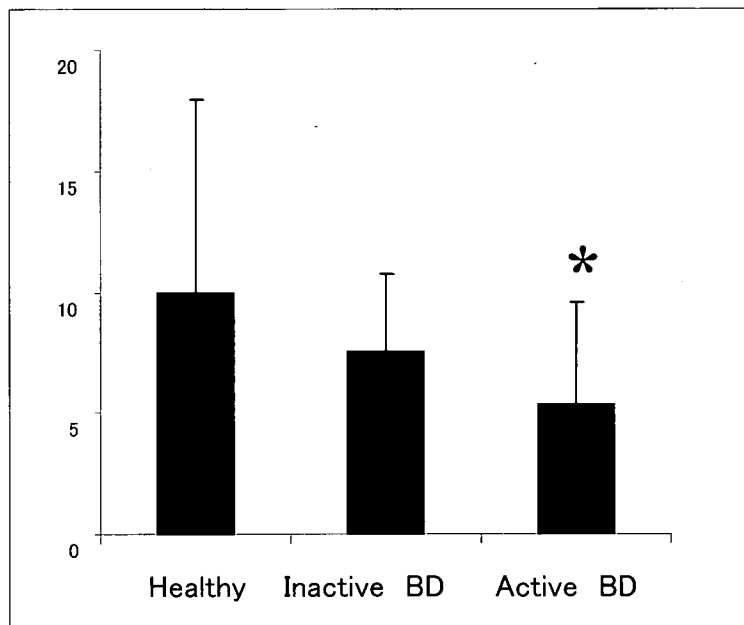


図2 ベーチェット病 (BD) 患者及び健常人 PMN における HO-1 mRNA 発現

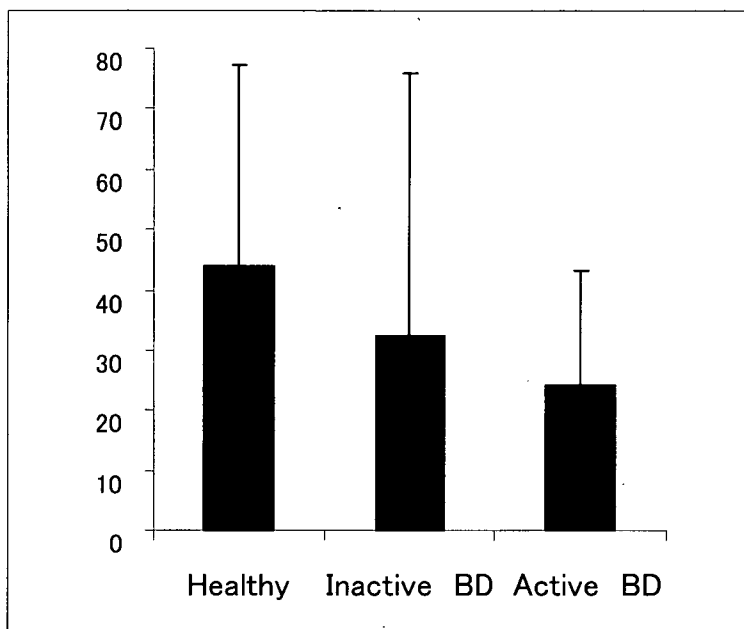
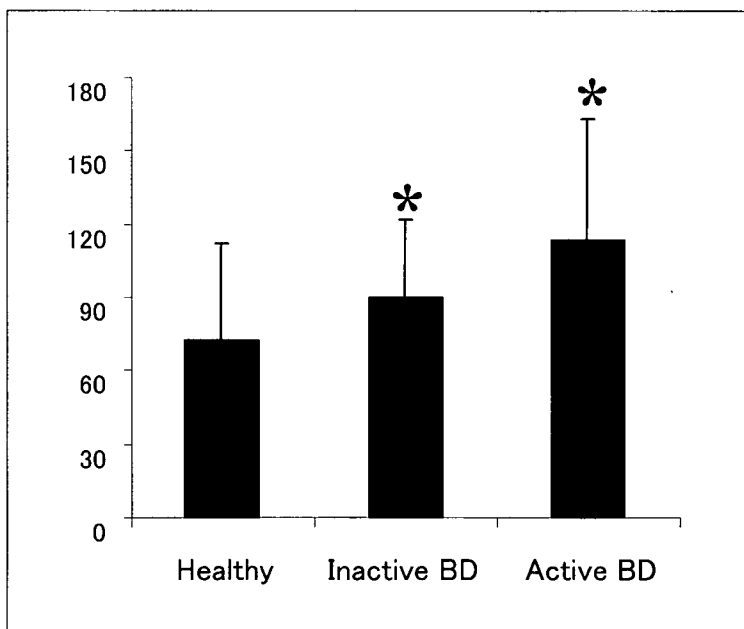


図3 ベーチェット病 (BD) 患者及び健常人 PBMC における TLR4 mRNA 発現 P < 0.05 vs healthy controls



ベーチェット病における TLR 刺激による indoleamine 2,3-dioxygenase の誘導

分担研究者 小林 浩子 (福島県立医科大学医学部内科学第二講座)
研究協力者 坂本 夏美 (福島県立医科大学医学部内科学第二講座)
片倉 響子 (福島県立医科大学医学部内科学第二講座)

研究要旨

Indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) は感染や炎症などが刺激となり、抗原提示細胞によって誘導される T 細胞増殖抑制因子であり、種々の免疫系の制御に寄与している。ベーチェット病 (BD) の末梢血単核球を toll like receptor (TLR) 4 リガンドである lipopolysaccharide (LPS) で刺激し、IDO mRNA の誘導を RT-PCR 法で測定したところ、健常人と比較し IDO の誘導が抑制されており、TLR9 リガンドである CpG-DNA 刺激でも同様の傾向がみられた。また、培養上清中の tumor necrosis factor (TNF) および interferon (IFN)- α 濃度を ELISA で測定したところ、BD 患者では健常人と比較し、LPS 刺激による TNF 誘導能が亢進しているにもかかわらず、IDO の誘導が抑制されている傾向にあった。また、CpG-DNA 刺激による IFN- α 誘導も BD 患者では健常人と比較し抑制されている傾向にあった。

A. 研究目的

これまで我々は、ベーチェット病 (BD) 症例では TLR9 リガンドに対する反応性が高まっている可能性を報告してきたが、いまだその機序は不明である。本実験では TLR 刺激によって誘導され、炎症の制御に重要な役割を果たしている Indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) の誘導において、BD 症例と健常人との間に差がみられるか検討することを目的とした。

B. 研究方法

健常人および BD 症例から末梢血単核球 (PBMC) を採取し、in vitro で TLR4 および TLR9 リガンドで刺激し、12 時間および 24 時間培養後、PBMC および培養上清を回収した。RT-PCR 法を用い、PBMC 上に発現する IDO mRNA の誘導を β -actin を house keeping gene として判定的に解析した。また、培養上清中の tumor necrosis factor (TNF) および interferon (IFN)- α 濃度を ELISA で測定した。

(倫理面への配慮)

十分なインフォームドコンセントの上同意を得られた場合検体を提供していただき、検体および情報の取り扱いについては当施設倫理委員会の定める規定に従った。

C. 研究結果

TLR4 刺激による IDO mRNA の誘導は、BD 症例において健常人と比較し抑制されており (図 1)、TLR9 刺激でも同様の傾向が見られた。また、BD 患者では健常人と比較し、TLR4 刺激による TNF 誘導能が亢進しており (図 2)、かつ TLR9 刺激による IFN- α 誘導は抑制されている傾向にあった (図 3)。

D. 考 察

BD では TLR 刺激による反応性が健常人と異なる可能性が示唆された。すなわち、誘導されるサイトカインのパターンが異なり、IDO に代表される制御系の分子が誘導されにくいいため、非特異的な微生物刺激により炎症が活性化されやすくかつ収まりにくいという病態が形成されている可能性