

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17～19年度 総合研究報告書

平成20年(2008)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.....	11
猪子 英俊 (東海大学医学部分子生命科学系遺伝情報部門)	
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	14
水木 信久 (横浜市立大学大学院医学研究科視覚器病態学)	
疫学的研究・発症に関する基礎研究ならびに新たな治療法の開発に関する研究.....	17
大野 重昭 (北海道大学大学院医学研究科視覚器病学)	
ベーチェット病におけるシクロスポリンの治療効果と遺伝子多型性.....	19
太田 正穂 (信州大学医学部法医学)	
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	23
太田 正穂 (信州大学医学部法医学)	
病因病態と発症外因子	
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.....	25
金子 史男 (福島県立医科大学医学部皮膚科学)	
ベーチェット病における HO-1発現低下と TLR 発現異常.....	28
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)	
ベーチェット病の細菌抗原に対する免疫反応に関する研究.....	31
小熊 恵二 (岡山大学大学院医歯学総合研究科病原細菌学)	
好中球および粘膜上皮由来の抗菌ペプチド CAP18/LL-37活性ドメインおよび カチオン性合成抗菌ステロイドによる新しい治療法へのアプローチ.....	34
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末梢血 NK 細胞の役割.....	40
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免疫異常及び炎症病態に関する研究.....	43
鈴木 登 (聖マリアンナ医科大学免疫学病害動物学)	

パーチェット病における血清 S100A8/A9 蛋白についての研究	52
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)	
パ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	56
中村晃一郎 (福島県立医科大学医学部皮膚科学)	
パーチェット病における GRO α の検討に関する研究	59
山本 俊幸 (福島県立医科大学医学部皮膚科学)	
パーチェット病における toll like receptor 9 遺伝子変異・多型に関する研究	61
小林 浩子 (福島県立医科大学医学部内科学第二講座)	
佐藤由紀夫 (福島県立医科大学医学部内科学第二講座)	

眼病変に関する研究

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	65
川島 秀俊 (さいたま赤十字病院眼科)	
パーチェット病の長期観察例における臨床像に関する研究	67
川島 秀俊 (さいたま赤十字病院眼科)	
近年の東京大学眼科におけるぶどう膜炎初診患者の原因別頻度	70
川島 秀俊 (さいたま赤十字病院眼科)	

実験動物モデルと新しい治療法の開発

パ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探索	
-①オステオポンチンを標的としたパーチェット病動物モデルの実験治療-	73
-②NKT 細胞を介入標的とした新しいぶどう膜炎治療法の開発-	77
-③樹状細胞による新規免疫応答制御法の開発-	81
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)	

疫学と QOL

パーチェット病患者の口腔保健と QOL に関する研究	85
内藤真理子 (名古屋大学大学院医学系研究科予防医学)	
パーチェット病患者の口腔保健と QOL に関する研究	88
内藤真理子 (名古屋大学大学院医学系研究科予防医学)	
パーチェット病の臨床調査個人票電子化データの分析 - 臨床疫学像と予後の検討	90
稲葉 裕 (順天堂大学医学部衛生学)	
パ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追跡調査結果	93
稲葉 裕 (順天堂大学医学部衛生学)	

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	97
--------------------------	----

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	准 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	眼科第二部長
	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 (平成17、18年度)	福島県立医科大学医学部皮膚科学	准 教 授
	山 本 俊 幸 (平成19年度)	福島県立医科大学医学部皮膚科学	教 授
	佐 藤 由紀夫 (平成17年度)	福島県立医科大学医学部内科学第二	〃
	小 林 浩 子 (平成18、19年度)	福島県立医科大学医学部内科学第二	講 師
	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	
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	〃	
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 教
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. 総括研究報告

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

ペーチェット病に関する研究は、昭和47年(1972)に本邦における難病特定疾患に指定され研究班ができて36年余りになる。その間その時代の医学知識に基づいて、病因・病態研究と治療法の研究が行われ、現代に至るまで大きな成果をあげてきた。本総括はこれまでの研究成果を現代知識で見直すとともに、班員の創意に基づいた研究成果の平成17-19年度にわたって行われたものを総括したものである。

1. 研究目的

平成15年(2003年)度に改訂されたペーチェット病(以下BDと略す)診断基準をもとに、BD患者の病勢を見直し、諸外国における研究成績についても十分な検討を行い、これまでの病因・病態研究方法を踏襲するとともに、新しい観点からBDの病因・病態の解明と疫学調査を継続する。従来、特殊型とされていた腸管型、血管型、神経型BDの診断基準の見直しと治療ガイドラインの作成を行う。本研究では、平成17年度からの3年間の研究成果をまとめるとともに、今後の新しい治療法の確立をめざすことを目的とした。

2. 研究方法

1) 発症内因子としての疾患責任遺伝子の検索

- a) BDは、HLA-B51近傍領域に疾患感受性遺伝子が存在すると推定される。BD患者の血液からDNAを抽出し、HLA-A,B,C遺伝子のハプロタイプをsequence based typing法で明らかにされたHLA-B*510101を選び出し、イントロンを含めて解析を進めた。
- b) 人種に関係なく遺伝子解析ではBD患者のpooled DNAについて全染色体、全ゲノムを対象として従来のsingle nucleotide polymorphisms (SNP)法に対してゲノムワイドなマイクロサテライト(MS)法にて測定した。一般にHLA-B51を有する患者では重症になる例が多く、HLA-B51とその近傍のmajor histocompatibility class I-related gene A (MICA)に関して、特に細胞膜

貫通性のMICA*009遺伝子発現の標的細胞と細胞傷害性細胞との関連を検討した。

2) 発症外因子の検索

- a) BD患者の口腔内では、健常人の細菌叢と異なる、KTH-1血清タイプの*Streptococcus(S.)sanguis*が検出されるが、これは岐阜タイプカルチャーの略称ではGTC1182, GTC1183, GTC1184株とされている。最近、その*S.*属の分類が分子遺伝学的に見直されていることから、これまでBD患者から検出された*S.sanguis*について新分類に準じて分類すると、*S.sanguinis*および*S.sanguinis*(以下*S.S*)として再分類された。この菌由来の分子量65kDaのheat shock protein (HSP)-65と生体側に反応性に出現するヒトHSP-60の両者の構造塩基配列における相関性の有無とBD患者の病態に及ぼすそれぞれの存在意義について検討を試みた。
- b) *S.S*のDNA抽出によりそのアミノ酸分析を行ったところ、眼網膜蛋白(*Brn-3b*)との塩基配列に相同部が存在していることが判明した。その相同部ペプチドを*Bes-1*と名付け、その*Bes-1*遺伝子を*E.coli*に導入(形質転換)させて、蛋白合成させ、このものをプライマーとしてBD患者の病変部の組織におけるPCR法およびPCR-in situ hybridizationでその存在をみた。そのことから*Brn-3b*, *Bes-1*, HSP-65/60について病態との関連を検討した。
- c) *S.S*由来HSP-65とヒトHSP-60の相同性塩基

配列部ペプチドは BD 患者の T 細胞エピトープと対応することが明らかにされた。これらの相同部ペプチド (LO1; 244-264, UK; 311-326, IIIa; 315-384, IIIb; 395-413, LO2; 480-499, LO3; 504-518) の塩基配列を合成して、それぞれを抗原として BD 患者末梢血単核球細胞 (PBMC) と健常人 PBMC を用いて、その反応による炎症性サイトカインの産生に及ぼす影響について検討を行った。特に、HSP、*Bes-1* の反応性については人種を超えてトルコの研究者グループとの共同研究を行った。

3) BD 患者の免疫応答の検討

- a) BD 患者の PBMC 中の T 細胞と樹状細胞 (dendritic cell; DC) の役割については、本症患者の免疫異常を知る上で重要である。しかも、活動期の患者では Th1 型の炎症性サイトカインが過剰に産生されている。すなわち、Th1 細胞を活性化する機序が働いていることから、自然免疫獲得の亢進をみるため微生物由来の CpG-DNA に対する反応と免疫組織学的検討を行い、細菌などの微生物に対する Toll-like receptor (TLR) -2, -4, -9 の関与とその役割について考察した。
- b) BD 患者における末梢血中の T 細胞と natural killer (NK) 細胞の反応の役割をさらに詳細に解析した。この Th1 細胞活性を起こす IL-12 分泌反応と HLA-B51 遺伝子との関係と、さらに S.S との関係について検討した。
- c) BD 患者では非活動期に補体値が高く、活動期に低くなる現象がみられる。このことから自然免疫の重要な役目を担う補体系のマンノース結合レクチン (MBL) 経路について SNP 法による遺伝子多型の面から検討を行った。
- d) 生体内の炎症性徴候について
 - i) 生体の炎症時の浸潤細胞の傷害作用について詳細なメカニズムを検討するために PBMC 中の NK 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞分析をサイトメトリー法で行った。
 - ii) 病変局所では炎症増幅因子の一つとして反応後に perforin, granulysin, proinflammatory mediator とした S100A8/9 蛋白が出現するが、傷害活性の指標とされているため、免疫組織学的に検出を試みた。

- iii) 生体がストレスを受けたときには、heme oxygenase(HO)-1 はヘムを CO とビリベルジン、 Fe^{2+} に分解し、その最終産物 (CO, ビリルビン、フェリチン) は抗酸化・抗炎症作用を示し、その誘導は生体内の自然代謝物を利用した抗炎症制御作用を担う。BD 活動期ではその活性が低下していることから末梢血中の HO-1 mRNA の発現と BD の病因との関連が示唆される自然免疫系レセプターの TLR 発現の関係を調べた。

4) 疾患責任遺伝子 (内因子) と免疫異常

BD 患者の HLA-B51 遺伝子と免疫系細胞の反応との関連については未だ不明の域を出ない。特に、活動期患者では Th1 型サイトカイン産生が優勢であるので、免疫細胞系 DC およびマクロファージにおける IL-12p40 mRNA の発現について HLA-B51 と S.S 関連を遺伝子多型の面から検討した。

5) 新しい治療法へのアプローチ

新しい治療法について下記が検討された。

- a) 生体内における抗炎症因子の発現と治療好中球、粘膜上皮細胞由来の抗菌ペプチド Cathelicidin family に属する分子量 18kDa の human cationic antimicrobial protein (CAP)-18 の治療への応用の可能性についての検討
- b) シクロスポリン治療による感受性に関する遺伝子発現の検討
- c) ステロイド剤の眼内への埋植治療の臨床治験
- d) ヒトキメラ型抗 TNF- α 抗体による治療ガイドライン作成の試み
- e) モデル動物における実験自己免疫性ぶどう膜炎 (EAU) を用いた抗オステオポンチン (OPN)・OPN siRNA の治療効果に関する検討

6) 腸管型 BD の診断と治療ガイドライン

BD の不全型に重篤な腸管症状を併発することがあるが、診断に苦慮しながらも、これまで、サラゾピリン 15-ASA および免疫抑制薬、ステロイド薬が経験的に使用されてきた。その理由として、腸管型 BD の症例そのものが稀少であるため、これまで、診断基準および治療指針が示されていない。今後、文献的報告例および経験例から consensus

basedによる診断・治療指針を早急に作成する必要がある。

7) 血管型および神経型 BD の診断と治療ガイドライン作成への検討

腸管型 BD と同様、従来 BD の特殊型として分類されているが、これらの特殊型に関しては、診断基準、治療指針が示されていないため臨床上、診断・治療に苦慮する場合も多い。腸管 BD と同様いずれも重篤な病態を呈し、診断・治療の均一化を計るためにも指針の作成が必要である。

8) 疫学調査と BD 患者の QOL に関する調査法の検討

- a) 疫学調査と患者の予後は2004年4月より特定疾患治療研究医療受給証所持者数を参照にして QOL と予後調査を開始した。
- b) 口腔内アフタに対する QOL に関しては General Oral Health Assessment Index (GOHAI) をもとに新しい尺度の開発を行い、全国患者2,400名を対象に調査を行った。

倫理面への配慮：研究推進に先立って、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、同意を得た上で採取して研究に用いた。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。

3. 研究結果及び考察

1) 発症内因子としての疾患感受性責任遺伝子

- a) 外国人を含む BD 患者の遺伝子 HLA-B*510101 のホモサンプルでは HLA-B51 遺伝子はプロモーター、エクソン1~8、イントロンの全ての遺伝子領域で塩基配列が一致していることが明らかにされた。このことから、BD の伝播に関しては中東諸国から東方に伝播された可能性

が強いことが推定された。日本人では、B*510101以外に A*2601は BD の完全型、眼症状、皮膚症状との関係が示唆された。

- b) 日本人の BD 患者のゲノムワイドな MS 法を用いた検索では1, 6, 17, 19番染色体のスクリーニングで9.0%の陽性率を得た。さらに、全常染色体、XY染色体23,465個を調べてみると0.6%の147個に p 値0.05未満の陽性を示した。
- c) HLA-B51陽性 BD 患者は一般に重症型になることが多いが、HLA-B51拘束性細胞傷害性リンパ球の標的になる MICA*009 遺伝子の発現組織との関連が明らかにされた。

2) 発症外因子について

- a) 発症外因のひとつとされる口腔内 *S.sanguis* は、分子遺伝学的手法から最近の細菌分類学に従って分類すると GTC1182と GTC1183株は *S.oralis* で GTC1184株は *S.sanguinis* (*S.S*) として分類された。
 - b) BD 患者の PBMC は *S.S* 由来 HSP-65 抗原に刺激されて IL-12と IFN- γ の強い産生を起こした。一方、BD 患者の中にはこの HSP-65 に対する抗体が出現し、*Helicobacter pylori* 由来の HSP-65 も高い IgG 抗体を有するものがあった。これらは抗 HSP-65 自己抗体と反応するが、生体内には HSP-65 の浸入に伴い反応性に出現する HSP-60 とその塩基配列に相同部が存在し、複雑な生体反応を示すことが推定された。
 - c) *S.S* 由来の *Bes-1* DNA は BD 患者病変部の組織から PCR により検出された。PCR-in situ hybridization では病変部毛細血管壁に吸着している単核細胞および炎症性浸潤細胞核内に検出された (Tojo, et al.: J Appl Res 3;232, 2003)。このことは、これらの DC およびマクロファージが口腔内組織から *S.S* 由来の *Bes-1* DNA を核内に取り込み、遠隔局所の血管に吸着し、*S.S* としての抗原性を発現して病変を起こしたものと解釈できる。
- 一方、従来 BD の原因の一つとして報告されてきたウイルスに関して、同様の方法でヘルペス・ウイルス (herpes simplex virus, EB virus, HHV-6,7) の存在をみたが検出できなかった

(Tojo, et al.: Acta Dermatol Venereol 83:124, 2003).

- d) *S.S* 由来の HSP-65 とヒトの反応性に生ずる HSP-60 との相同性の高い領域 6 箇所 (LO1, UK, IIIa, IIIb, LO2, LO3) は BD 患者の T 細胞のエピトープとも相同性がある。それらの合成ペプチドを抗原として 7 日間の長期培養すると、健康人 PBMC は刺激され炎症性サイトカインの産生をおこすが、BD 患者の活動性 PBMC は、LO1 によって IL-12, INF- γ , TNF- α , IL-8 の産生の抑制が起こり、LO2 により TNF- α , UK により IL-8 産生も抑制された。さらに、その抑制機序として IL-16, IL-13 receptor α -1, IL-17 の mRNA の発現が減少することが示唆された。この結果から、これらの peptide が T 細胞の CD58, FK506 binding protein に結合する可能性が示唆された。この現象は、既に英国、Lehner らの研究グループが UK の領域とその増幅剤として cholera toxin B との結合剤により、BD 患者のぶどう膜炎の進行を抑えたという報告 (Stanford, et al.: Clin Exp Immunol 137:201, 2004) からも、これらのヒト HSP-60 の相同部ペプチドは BD 患者に免疫寛容を誘導する生物製剤として利用できる可能性を示した。
- 一方、HSP-65/60, *Bes-1* は両者の塩基配列に相同性が存在することが判明し、日本人 BD 患者ばかりではなくトルコ人研究者との共同研究により、一見矛盾のようであるが、短期培養で同国患者の PBMC もサイトカイン産生を示し、有意に刺激することが報告され、民族を超えて同様の成績で *S.S* が BD の発症外因子としての可能性が強調された。

3) BD 病変出現に関与する免疫現象

- a) BD 患者の PBMC, 病変部の結節性紅斑様皮疹および腸管型 BD の生検組織から HSP-65/60, Th 1 細胞の転写因子 Txk 蛋白の発現について検討した。PBMC および病変部には HSP-65/60 の過剰な発現と IL-12, INF- γ , TNF- α および CCR5, CXCR3 の発現の亢進を認めた。
- b) BD 患者の PBMC 中では活動期には CD3⁺T 細胞のうち CD8⁺ CD69⁺ T 細胞が多く、また本来粘膜組織に存在する CD69⁺ γ δ T 細胞が増

加していることが明らかになった。しかし、CD4⁺ CD69⁺ T 細胞の比率には活動期と非活動期とにおいて変化がみられなかった。NK 細胞については活動期では活性化されている (NK1 細胞) が、非活動期では IL-12R β 2, perforin, granzyme B の mRNA 発現が低く、いわゆる NK2 細胞になっている可能性が判明した。

- c) DC およびマクロファージは抗原情報伝達細胞 (antigen present cell; APC) として重要な役割を演じている。この APC を通じて自然免疫の獲得が行われる。既に、BD 患者では *S.S* の抗原性を獲得し、異常な過敏反応を呈することが明らかにされている。しかしながら、この抗原性獲得に関する詳細な機序は不明である。微生物ゲノム中に存在する CpG DNA は直接哺乳類の B 細胞, DC, 単球を活性化して Th1 型炎症性サイトカインを産生させる。BD 患者の PBMC に CpG DNA を加えて培養すると有意に強い細胞増殖反応が見られた。すなわち、TLR-9 を介して細胞の活性化が行われたことを示唆している。
- 一方、腸管病変部に免疫学的検討から TLR-2, TLR-4 が発現されており、これは組織の HSP-65/60 発現と相関していることが示唆された。同様に、神経型 BD 患者の髄液中にも TLR-2, TLR-4 が検出されている。
- d) BD 患者の APC は IL-12 を産生し、病変部において強い Th1 型反応を起こす。その BD 患者の APC 中の IL-12p40 のプロモーター領域の遺伝子は allele A:80, allele C:94 で、健康人では allele A:66, allele C:64 であった。BD 患者には遺伝子多型に高い傾向はあるが、健康人との比較において有意な差はなく、また HLA-B51 陰性、陽性とも関連がみられなかった。しかし、HLA-B51 陰性の BD 患者の PBMC は *S.S* 抗原に刺激され、有意に IL-12p40 の産生と、IL-12p70 mRNA の発現を示した。
- 一方、BD 患者の病変部の浸潤細胞は単核球のみならず好中球の浸潤も認められる。この好中球の浸潤機序に関しては、IL-8 をはじめとするケモカイン (CCR5, CXCR3 発現) の分泌が指摘されている。すなわち、これらの浸潤 T 細胞, NK 細胞による細胞傷害性が活性化されて Th1

細胞系からは TNF- α , IFN- γ が産生されている。

4) 血清免疫と補体系反応について

これまで BD 患者では IgA, IgD が高値であり、補体系については非活動期において補体価が異常に高いことが知られている。クローン病と潰瘍性大腸炎では anti-Saccharomyces cerevisiae Mannan 抗体 (ASCA) が高値で、診断にも応用されていることから、BD 患者においても検討を行ってみた。結果は、BD 患者では ASCA-IgA および ASCA-IgG のいずれも健常人より高値であった。

一方、補体マンノース結合レクチン経路の活性は健常人との差はなく、遺伝子多型においても有意の差はないが、プロモーター領域において HLA-B51陽性 BD 患者において ficolin-2 遺伝子の -557A > G, -64A > C で多型性が認められた。このことから HLA-B51陽性患者のマンノース系補体経路が亢進している可能性が示唆された。

5) 生体内に存在する炎症抑制因子と炎症

a) CAP18はルイスラット (6週雄) にリポ多糖 (LPS) で誘導した実験的ぶどう膜炎の進行を抑制した。この作用は LPS の TLR への結合にたいする CAP-18による結合阻害であることが示唆され、口腔内の細菌に対して強い抗菌作用を示した。同様に新規に開発されたカチオン性合成ステロイド (CSA-13) は類似の作用を有することが判明した。このため、合成 CSA-13 の使用により CAP-18に比べて安価に治療に応用できる可能性がでてきた。

b) HO-1については、BD 患者の末梢血多核白血球や活動期 BD 患者の単核球には TNF 産生の抑制など抗炎症作用を示す HO-1 mRNA の発現が弱い。また、BD 患者の単核球では TLR4 mRNA の発現が増強されている。TNF は HO-1 を抑制し、HO-1産生の抑制は TNF 産生を増強する。一方、LPS 刺激により HO-1の発現が抑制されることから、BD では LPS などの刺激が過剰に発現している TLR4を介して HO-1の発現が抑制され、それによる TNF の過剰産生がさらに HO-1を抑制する悪循環が生じている可能性が示唆された。

6) 新しい治療開発へのアプローチ

a) BD 患者のぶどう膜炎のステロイド治療

ステロイド剤のぶどう膜炎局所に点眼、結膜下注射、後部テノン下注射なども従来行われてきたが、フルオシノロンアセトニド眼内埋植 (インプラント) が注目されている。すなわち、トリアムシノロン 4 mg を硝子体内に注入し、眼内に直接埋植により徐放による抗炎症効果を期待したものである。特に網膜、脈絡膜への有効性が高く、安全に使用できることが明らかになった。

b) シクロスポリンは強力な免疫抑制作用による治療効果を期待できるが、その効果には個人差がみられる。すなわち、薬剤感受性に関与する遺伝子多型が存在すると考えられる。シクロスポリン結合体の標識分子は、カルシニューリン A (Cn A) と機能サブユニットの CnB から構成されている。CnB の SNP から 4 種を選択して、その多型性をみるとハプロタイプ解析において有意差が出て、結果はシクロスポリン感受性患者と非感受性患者とに相関が示唆された。

c) ヒトキメラ型抗 TNF α 抗体治療

近年関節リウマチ (RA)、クローン病の治療に有効とされ、インフリキシマブの適応とされて治療成績が報告されている。昨年 1 月に BD の重症ぶどう膜炎患者に本治療薬が適応され、治療成績が注目されている。その使用に関する治療ガイドラインの作成が急がれるところである。従来の試用期間とこのたびの研究期間においてインフリキシマブで、5 mg/kg 量で、0 週、2 週、6 週、14 週目と臨床症状を診ながら減量する方法で、ぶどう膜炎の進行を抑制する良結果を得た。今後、さらに詳細な使用ガイドラインを作成してゆく必要がある。

d) BD 動物モデルに試みる治療薬の開発

マウスに誘導した実験的自己免疫性ぶどう膜炎 (EAU) に対するオステオポンチン (osteopontin: OPN) による免疫応答の偏倚を検討した。OPN は分子内に Arg-Gly-Asp 配列を有し、細胞外マトリックスとして機能するが、Th1タイプの免疫応答に影響を与えることが明らかにされている。OPN ノックアウトマウスでは EAU が軽微化するが、ワイルドマウスに EAU を誘導して、

抗 OPN 抗体あるいは OPN small interferin (si) RNA を導入した群には、いずれもぶどう膜炎の発症遅延・軽症化とそのマウスの所属リンパ節からの T 細胞の産生する IFN- γ , TNF- α が有意に低下していた。この成績と既に明らかにしてきた NF- κ B 阻害薬の EAU に対する成績とを比較検討し、将来的にぶどう膜炎の治療に期待している。

7) 腸管型 BD の診療ガイドライン

腸管型 BD は臨床的にクローン病、潰瘍性大腸炎など、他の炎症性腸疾患との鑑別が必要である。難治性炎症性腸管障害に関する調査研究班（主任研究者 慶應義塾大学 日比紀文教授）の協力を仰ぎ「診療ガイドライン開発と診療オプションの策定」の際に用いられた方法論を参照にして consensus based に基づいたガイドラインを作成中である。

8) 血管型 BD, 神経型 BD の診療ガイドライン

研究協力者として北里大学医学部膠原病・感染内科学 廣畑俊成教授、帝京大学医学部外科学 新見正則准教授に参加いただき夫々の病型の特徴をまとめ、診療ガイドライン作成にむけて準備を開始した。

9) BD の疫学調査による臨床疫学, QOL と予後

a) 厚労省臨床調査個人票の平成15年新規、16年度更新データの1,589例について「変化なし」、「軽快」、「重症移行」、「不明」について検討したところ、「変化なし」1,174 (73.9%), 「軽快」は94 (5.9%), 「悪化」は97 (6.1%), 「不明」は212 (13.3%) という結果を得た。今後、治癒、死亡などの確認が重要であることが認識された。

b) BD 患者には口腔内アフタ性潰瘍は必発に近いが、この出現によって摂食・構音など口腔関連機能障害が起きる。患者の日常生活に与える影響は無視できない。このようなことから、口腔内アフタ性潰瘍の出現に対する QOL の研究は大切である。その QOL の尺度として GOHAI の日本語版を作製している。その結果、BD 患者は健常人に比べて低い QOL を有し、特に女性に低く、歯磨き回数に差がみられた。

4. 評価

1) 達成度について

a) BD 患者の診断基準の改訂

これまでの BD 患者診断基準（1987年改訂）では患者の活動期、重症度基準、寛解状態、QOL、および予後の判定などの調査が出来ないことから、これらを網羅した新しい診断基準（2003年改訂）に新規、更新書類に病期の活動性ならびに非活動性明記を設定した。これにより診断された BD 患者のデータを用いて、特に疫学調査には今後の興味ある結果が得られそうである。

b) 感受性責任遺伝子の検討

本研究班ではこれまでに BD 患者の DNA の HLA-B51 周辺の感受性責任遺伝子について SNP 解析および MS 法によって検討し、感受性遺伝子は HLA-B*510101 の近傍にあり日本人患者とイラン、ヨルダン、トルコ人との比較から、BD のルートは地中海沿岸から、シルクロード沿いに東方に伝播した可能性を示した。一方、この HLA-B51 陽性、陰性 BD 患者に免疫学的反応に相違があることが明らかになり、特に症状の出現は HLA-B51 陽性患者と MICA*009 遺伝子発現との関係が明らかにされた。

c) BD 発症の外因子について

BD 患者では口腔内の S.S に対する感染アレルギーによるとの立場から考えると、S.S 由来の *Bes-1* DNA および HSP-65 が病変部に存在していることは重要所見である。また菌由来の HSP-65 と生体側に生ずる HSP-60 の反応はこれまで炎症増幅作用があると考えられてきた。しかし、患者の PBMC との反応から HSP-65 のペプチドの一部が抑制反応を示すことが明らかにされ、その HSP-65/60 の相同部は T 細胞のエピトープに対応し、相同部ペプチドは免疫寛容を誘導できる可能性が示唆された。これにより、今後の新しい治療法に利用出来る可能性がある。

また、*Bes-1*, HSP-65/60 は人種を超えて日本人 BD 患者と同様な反応を示すことが判明し、S.S が重要視されてきた。

d) BD 患者の免疫状態について

BD 患者の免疫状態および病変部局所の免疫状

態の Th1型の反応が寛解に陥ると、Th2型の反応にシフトすることも明らかになってきた。したがって、免疫学的な治療は Th2型へのシフト誘導が重要であることが示唆された。

e) 腸管型 BD の診療ガイドラインの作成

BD 特有の炎症性腸疾患の診断と治療方針を明らかにすることと、さらに血管型および神経型 BD の臨床的特徴と診断基準を決めることは治療に重要なことである。

f) 新しい治療への挑戦

生体内の CAP-18/CSA-13, HO-1などの抗炎症因子の発現誘導による治療の効果を検討した。

g) 疫学調査, QOL および予後調査

BD の疫学調査は2004年に行われ、このたびの診断基準の改訂による今後の調査結果が期待され、また BD 患者の口腔内症状に対する QOL に対する基準を新しく設定することも重要である。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

a) 遺伝子学的研究

BD は地中海沿岸諸国の中東諸国を中心にいわゆる、北シルクロード沿いの地方をへて中国北部、韓国、日本に多い疾患である。内因子としての疾患感受性責任遺伝子の解析が諸外国においても著しく進展してきている。

b) 発症外因子としての S.S をめぐる研究

口腔内の常在菌として、これまで無視されてきた KTH-1血清タイプの S.S が本症に重大な役割を演じていることについて注目したことは本邦における研究が初めてであり、現在では国内外においても BD 研究者の注目するところとなり、最近ではトルコの研究者も類似の成績を発表している。

c) 新しい治療法への挑戦

従来重症 BD の治療としての、シクロスポリンに対して感受性遺伝子に多型性のあることが判明し、その感受性遺伝子の有無により有用性の検討が出来うる可能性がでてきた。

生物製剤の使用効果とその使用法の検討を行った。すなわち、ヒトキメラ型抗 TNF- α 抗体による治療を行い、治療成績を得た。

また、HSP-60相同ペプチド、CAP18/CSA-13,

HO-1などの分子標的治療の可能性についても検討された。ヒト HSP-60相同ペプチドによる治療の試みは、英国 Lehner らの研究グループ以外にはまだ行われていないが、その作用機序が明らかになりつつある。

3) 今後の展望について

a) われわれは、既に HLA-B51, その近傍の遺伝子 MICA, MICB によるトランスジェニックマウスを作製したが、BD モデルとはなり得なかった。しかし、今後はこれらのマウスの DC に組換え体レンチウイルスベクターを利用して外因子遺伝子、*Bes-1* DNA などを挿入して BD モデルマウス作製を行う必要がある。

b) 多くの BD 患者（地中海沿岸諸国、韓国、日本）からの DNA 検索により、HLA-B*510101 の起源を探るとともに、他の遺伝子との組み合わせによる臨床型の比較検討を行う。

c) 発症内因子と外因子の関連を SNP 法にて検討し、さらに遺伝子多型の有無について検討する必要がある。

d) S.S 由来の HSP-65とヒト HSP-60の相同部を用いた生物製剤による免疫寛容治療の実現を企画したい。

e) 生体内に生ずる抗炎症物質の発現誘導に関する治療研究を推進させる。

f) BD 患者の予後と QOL に関する調査を推進すること。

g) 腸管型、血管型、神経型 BD の診療ガイドラインの作成すること。

5. 結 論

平成15年度（2003年）に改訂された BD 診断基準をもとに診断された患者の試料を用いて検討を行った。

1) BD の発症内因子

BD では内因子として HLA-B*510101遺伝子解析から本症が中東地域に発症し、東方に伝播した可能性が示された。その発症に HLA-B51遺伝子はストレスにより発現される MICA*009遺伝子と重要な関連を有することが明らかにされた。また、発症外因子としての S.S 由来 HSP-65/60, *Bes-1*

DNA との関連が示唆されてきた。

2) BD の発症外因子

発症外因子のひとつ BD 患者の口腔内細菌 *S. sanguis* は新しい分類では *S. sanguinis* に属する。BD 病変部に HSP-65/60, *Bes-1* DNA が存在し、浸潤細胞に TLR-2, -4 が表現されている。この現象は、日本人患者のみではなく、人種を超えて同様であることが報告された。この菌由来の HSP-65 と、生体に出現するヒト HSP-60 の相同部ペプチドは BD 患者の T 細胞エピトープと対応し、BD 患者の PBMC の炎症性サイトカイン産生を抑制した。

3) BD 患者の免疫現象

BD 病変部、PBMC には活動期には CD8⁺ CD69⁺ T 細胞、CD69⁺ $\gamma\delta$ T 細胞が増加し、ケモタキシスレセプター CCR5, CXCR3 が亢進していた。さらに、ストレスにより活動期 BD 患者組織に MICA*009 遺伝子が発現されると、これらの反応が増幅された。一方、BD 患者の DC は *S.S.* 由来抗原を加えると強い IL-8 の産生を起し、TLR-2, TLR-4 の発現が明らかになり、TLR-9 の発現の関与も示唆された。

4) 腸管型、血管型、神経型 BD の診療ガイドラインの作成

腸管 BD 患者についての診断・治療法については未だ確立されていないため、治療ガイドラインの作成が重要である。併せて、血管型、神経型 BD の臨床的特徴をまとめ、これらの診断・治療ガイドライン作成も急務である。

5) 新しい治療への挑戦

- a) 生体内に存在する抗炎症作用を示す CAP18/CSA-13, HO-1, などの誘導あるいは生物製剤として治療への応用の可能性を探る。
- b) ステロイド剤の眼内挿入法の効果を詳細に検討する必要がある。
- c) シクロスポリンの感受性に関する遺伝子の検討から、感受性遺伝子の有無による適切な治療を行うことが可能になった。
- d) 動物の実験的自己免疫性ぶどう膜炎を利用して、その新しい治療法、特にオステオポンチン

産生・機能抑制による治療の試みが行われ、その成績を将来的にヒトへの応用を考える必要がある。

- e) ヒトキメラ型 TNF α 抗体の腸管型、血管型、神経型 BD への治療適応拡大と、その治療ガイドラインの作成が必要である。

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)
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)
勝山 善彦 (信州大学附属病院薬剤部)
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)
西田 朋美 (聖隷横浜病院眼科)
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網羅的な同定を試みた。本研究では患者、健常者ともに300検体ずつを対象に相関解析を行った。

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。本病は遺伝要因の関与のもとに何らかの環境要因が作用して発症する多因子疾患と考えられている。遺伝要因として 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

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が存在する。すなわち、患者群と対照群で各 MS 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。本研究では、全染色体を網羅する23,465個の MS マーカーを用いて、ゲノムワイドにスクリーニングを行う。

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100検体で構成される3集団の全てにおいて、患者群と健常群の比較で有意差を認めた MS のみを本病と相関する陽性 MS マーカーとする。得られた陽性マーカーについて、pooled DNA に用いた全300検体による individual DNA タイピングを行い、真の陽性 MS マーカーを決定する。

(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。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

23,465個の全てのMSマーカーについて3段階のpooled DNAスクリーニングを完了し、147個のMSが本病と相関を示した(図1)。147個の陽性MSマーカーから偽陽性を除外するため、individual DNAタイピングを行った結果、本病と真に相関を示すMSを6個検出した(表1)。6個のMSのうち3個が6番染色体に位置し、HLAクラスI領域に存在する2個のMSがP値0.0001未満と本病と顕著に相関していた。また、3番、12番および22番の各染色体に陽性MSマーカーが1個ずつ存在した。

D. 考 察

本MSマッピングにより本病と相関する6個のMSを見出した。MSの連鎖不平衡の距離は約100kbと見込まれるため、本研究で同定した6個のMSの100kb前後の領域に本病の疾患感受性遺伝子が存在することが示唆される。

6個のMSのうち、6番染色体のHLAクラスI領域(6p21.3)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近傍に位置しており、本病との顕著な相関はHLA-B遺伝子との強い連鎖不平衡に起因するものと考えられた。一方、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遺伝子以外の疾患感受性遺伝子が存在することが強く示唆された。

また3p12、6q25.1、12p12.1および22q11.22の4領域に1個ずつの陽性MSマーカーが存在した。4領域のうち、536G12AとD12S0645iが各々位置する6q25.1と12p12.1の2領域はKarasnehらがトルコ人を対象としたゲノムワイドな連鎖解析で検出した疾患感受性領域(6q25-26、12p12-13)と一致するため、536G12AとD12S0645iの近傍もまた本病の有力な疾患感受性領域であることが示唆された。

E. 結 論

全染色体を網羅する23,465個のMSから本病と相関を示す6個のMSを検出した。本病との顕著な相関が知られるHLA-B遺伝子の極めて近傍のMSが陽性を示したことから、残り5個のMSの近傍領域にも本病感受性遺伝子が存在することが示唆された。今後、候補領域内のSNP解析を行い、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

論文発表

1. Tamiya G, Shinya M, Imanish T, et al: Whole genome association study of rheumatoid arthritis using 27,039 microsatellites. *Hum Mol Genetics* 14: 2305-2321, 2005.
2. Kawashima M, Tamiya G, Oka A, et al: Genomewide association analysis of human narcolepsy and a new resistance gene. *Am J Hum Genet* 79: 252-263, 2006.
3. Bahram S, Inoko H: Microsatellite markers for genome-wide association studies. *Nature Reviews Genetics* 8: 164, 2007.
4. Yatsu K, Mizuki N, Hirawa N, et al: High-resolution mapping for essential hypertension using microsatellite markers. *Hypertension* 49: 446-452, 2007.

H. 知的財産権の出願、登録状況

特許申請

1. 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
2. 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8月21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

3. 名称：関節リウマチ検査用マーカー遺伝子

発明者：田宮元，猪子英俊，五條堀隆

出願日：2005年3月29日

出願人：猪子英俊，東海大学

国際出願番号：PCT/JP2005/5904

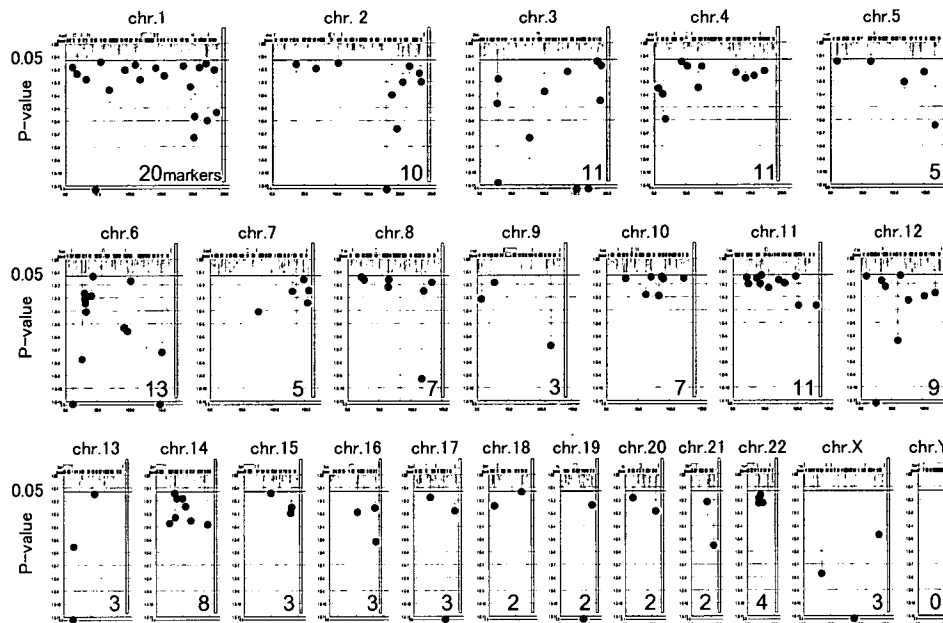


図1. Pooled DNA スクリーニングで得られた147個の陽性マイクロサテライトマーカーの分布

●：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 (信州大学附属病院薬剤部)
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。我々は HLA クラス I 領域内の遺伝的多型を調査し、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。本研究では、HLA クラス I 領域内の遺伝的多型を網羅的に調査し、HLA-B51 アリル以外の他の疾患感受性遺伝子の存在を検討した。

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 について相関解析と LD 解析を行った。また、多型解析に先立ち、配列特異的なオリゴ DNA プローブを蛍光ビーズに固相することで最大 100 種類の変異の有無が同

時に検出可能な技術である蛍光マイクロアレイビーズシステム (Luminex システム) を用いて日本人の HLA 遺伝子型を高解像度で判定する PCR-SSOP-Luminex (PCR-sequence specific oligonucleotide probes-Luminex) 法の開発を行った。

(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。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

本研究では、HLA クラス I 領域を対象とした多型解析に先立ち、日本人の HLA 遺伝子型に対応した PCR-SSOP-Luminex 法の開発を行い、大量検体のハイスループットかつ高解像度の判定を可能にした。^{1) 2)} この PCR-SSOP-Luminex 法を用いることで、HLA-A および -B 遺伝子の 4 桁アリルタイピングを 99.9% 以上の正確な確率で迅速に行うことができた。

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、