

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。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-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,  $P_c=1.16 \times 10^{-4}$ )。

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、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

本研究で開発された日本人に対応した PCR-SSOP-Luminex 法の開発により、大量検体の HLA 遺伝子の多型を高解像度で迅速かつ正確に判定することが可能となった。

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\*5101 アリルが本病と最も強固に相関していた。一方、HLA-A\*2601, HLA-F\*010101 および HLA-G\*010102 アリルも本病と相関しており、いずれかが 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考えられた。ハプロタイプ解析および連鎖不平衡 (LD) 解析の結果を考慮すると、HLA-A\*26 サブタイプが本病発症のリスクを増大させる真の感受性遺伝子であることが示唆された。HLA-A\*26 サブタイプは HLA-B\*5101 アリル陰性群の比較で、

本研究で解析した全てのアリルの中で最も強く本病と相関していた (表 1)。

## E. 結 論

HLA クラス I 領域内の網羅的な遺伝的多型の調査を行った。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。

## F. 健康危険情報

特記事項なし。

## G. 研究発表

### 論文発表

1. Itoh Y, Mizuki N, Shimada T, et al: High-throughput DNA typing for HLA-A, -B, -C and -DRB1 by PCR-Luminex method in Japanese population. *Immunogenetics* 57(10): 717-729, 2005.
2. Itoh Y, Inoko H, Kulski JK, et al: 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* 67(5): 390-394, 2006
3. Chen X, Katoh Y, Nakamura K, et al: Single nucleotide polymorphisms of Ficolin 2 gene in Behcet's disease. *J Dermatol Sci* 43(3): 201-205, 2006.
4. Yanagihori H, Oyama N, Nakamura K, et al: Role of IL-12B promoter polymorphism in Adamantiades-Behcet's disease susceptibility: An involvement of Th1 immunoreactivity against *Streptococcus Sanguinis* antigen. *J Invest Dermatol* 126(7):1534-1540, 2006.
5. Ito A, Ota M, Katsuyama Y, et al: Lack of association of Toll-like receptor 9 gene polymorphism with Behcet's disease in Japanese patients. *Tissue Antigens* 70(5): 423-426, 2007.
6. Mizuki N, Meguro A, Tohnai I, et al: Association of MICA and HLA-B Alleles with Behcet's Disease in Turkey. *Jpn J Ophthalmol* 51: 431-436, 2007.
7. Katsuyama Y, Ota M, Mizuki N, et al: MDR1 polymorphisms effect cyclosporine AUC0-4 in

Behcet's disease patients. *Clinical Ophthalmol* 1(3): 297-303, 2007.

8. Meguro A, Ota M, Katsuyama Y, et al: Association of the Toll-like receptor 4 gene polymorphisms with Behcet's disease. *Ann Rheum Dis*, in press.

## H. 知的財産権の出願, 登録状況

特許申請

1. 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

表1. 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 <sup>-5</sup>	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 <sup>-6</sup>	7.99x10 <sup>-5</sup>	0.259	0.106	2.96	4.54x10 <sup>-8</sup>	3.63x10 <sup>-7</sup>
表現型										
A*2601	0.257	0.140	2.12	0.00047	0.0089	0.338	0.145	3.01	1.21x10 <sup>-5</sup>	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 <sup>-7</sup>	7.81x10 <sup>-6</sup>	0.485	0.196	3.86	4.00x10 <sup>-9</sup>	3.20x10 <sup>-8</sup>

## 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

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 南場 研一，北市 伸義，有賀 俊英，竹本 裕子，北村 瑞，  
宮崎 晶子，岩田 大樹，水内 一臣，堀江 幸弘，大神 一浩，  
白取 謙治，鈴木由香利，金 学海，陳 進輝，小原 睦子，  
斎藤 朱里，佐藤 出，福本 敦子，吉田 和彦，青柳麻衣子  
（北海道大学大学院医学研究科眼科学分野）

我々はベーチェット病に関する研究として、1、疫学的研究、2、発症に関わる基礎研究、3、新たな治療法の開発に関する研究、と3つの研究を行ってきた。

まず、1、疫学的研究として、韓国ベーチェット病患者の HLA-B51 遺伝子の検討、ベーチェット病眼病変の国際疫学調査、小児発症ベーチェット病の臨床像に関する国際共同研究を行った。

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例を比較検討した結果、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,  $P=0.029$ ）。このことから、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ことがわかった。

ベーチェット病眼症状を世界規模で把握するため、同一の調査用紙を用いて性別、発症時年齢、HLA-B51の有無、最終受診時視力等について国際疫学調査を行った。調査は世界132カ所のぶどう膜炎専門外来を有する眼科センターに依頼し、14カ国25施設から1,465人分の臨床データを得た。その結果、男女比は男性68.3%，女性31.7%，発症時平均年齢は27.5歳であった。HLA-B51陽性率は62.0%，最終視力が0.1未満の視力予後不良率は23.3%であった。国別ではインド，イラン，日本は視力予後不良，イタリアは視力予後良好であっ

た（ $P<0.01$ ）。男性は女性より視力予後が不良であった。国によって臨床像に違いがあり、世界規模での眼症状の正確な把握と視力予後向上のためにさらなる臨床的・基礎的研究を積み重ねる必要がある。

小児発症ベーチェット病の臨床的特徴を把握するため、14カ国25の眼科施設から提供された15歳以前発症の135例と16歳以降発症の1,313例の臨床症状を比較検討した。成人発症者ではヨーロッパ人35%，ペルシャ（イラン）人24%，アラブ人21%，アジア人19%であり、この4人種で全体の99%を占めた。一方、小児発症者ではヨーロッパ人43%，ペルシャ人37%，アラブ人17%であるのに対し、アジア人はわずか2%で小児ベーチェット病の発症率は人種により大きく異なっていた（ $P<0.01$ ）。小児発症者の93%は少なくとも片眼は最終視力が0.1以上であり、成人発症者より視力予後は良好であった（ $P<0.05$ ）。小児発症者では外陰部潰瘍の出現は38.7%で成人発症者より有意に低頻度であった（ $P<0.01$ ）。

次に、2、発症に関わる基礎研究として、NF- $\kappa$ 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（EIU）に対するアスタキサンチンの抑制効果、human cationic antimicrobial protein 18（hCAP18）によるラット自己免疫性ぶどう膜網膜炎（EAU）の抑制、抗炎症作用の知られていない既存薬剤のぶどう膜炎に対する有用性について研究を行った。

アスタキサンチン（AST）はカロテノイドの一種であり、抗酸化作用をはじめとする種々の薬理作用が報告され、近年NF- $\kappa$ B活性を抑制することが示唆されている。ラットにLPSを投与すると6時間後から前房水中に炎症細胞が浸潤し、

経時的に炎症細胞数, タンパク, NO, PGE2およびTNF- $\alpha$ 濃度は著しく増加した. 一方, LPS群と比較して, AST群は前房水の炎症細胞数, タンパク濃度, NO濃度, PGE2濃度およびTNF- $\alpha$ 濃度を6, 12, 24時間ともに有意に減少させた. AST 10, 100mg/kg投与群は虹彩・毛様体におけるNF- $\kappa$ B陽性細胞数を濃度依存的に抑制した. EIUにおいて, ASTは濃度依存的にEIUの炎症因子を抑制し, 炎症サイトカインネットワークを支配する虹彩・毛様体におけるNF- $\kappa$ B活性を抑制する結果と一致した.

hCAP18は好中球由来の塩基性タンパクであり, C末端側の27個のアミノ酸からなるペプチドはLPS結合能があり, エンドトキシンショック敗血症の治療に有効であることが知られている. hCAP18の抗炎症作用を詳細に検討するため, ラットEAUにおけるhCAP18の治療効果を検討したところ, hCAP18の50,100 $\mu$ g群はEAUを有意に抑制した.

マウスEAUにおいて, 1, 胃粘膜保護薬Geranylgeranylacetone (GGA), または2, 高血圧・心不全治療薬Losartan-Kを経口投与して重症度, 発症日を検討したところ, 免疫後21日目の組織学的重症度は対照群では $1.63 \pm 0.18$ , GGA投与群では $0.33 \pm 0.17$ であった ( $P=0.027$ ). また, 対照群のEAU発症日は免疫後 $14.06 \pm 1.70$ 日であったのに対し, Losartan-K投与群の発症日は免疫後 $15.72 \pm 1.87$ 日であった ( $P=0.018$ ).

また, 3, 新たな治療法の開発に関する研究としては, ベーチェット病による網膜ぶどう膜炎に対する抗TNF- $\alpha$ 抗体治療に関する研究, ベーチェット病に伴う続発緑内障に対する新たな緑内障手術方法についての研究を行った.

網膜ぶどう膜炎を伴うベーチェット病に対して抗ヒトTNF- $\alpha$ モノクローナル抗体インフリキシマブによる治療をおこなった6症例について有効性および合併症について検討したところ, インフリキシマブへ切り替え前に1回~10回(平均5.7回)/年みられていた眼炎症発作が, 切り替え後は1症例にみられた1回を除き, 全く見られなかった. 投与前のスクリーニング検査では全例で異常がみられず, 抗結核薬の予防投与は必要としなかったが, 治療毎の内科医の診察を義務づけ

た. 1例で投与時反応が見られたが治療継続が可能であり, その他感染症を含む重篤な合併症はみられなかった. インフリキシマブはベーチェット病において眼炎症発作抑制に優れ, また, 入念なスクリーニング検査, 内科医との密接な診療連携により, 安全に治療を遂行することが出来ることが示唆された.

6-0プロリン糸を用いて線維柱帯を全周切開する360° suture trabeculotomy (以下, SL) 変法を考案し, ベーチェット病に伴う続発緑内障患者に施行した. この手術方法は既存の手術法である代謝拮抗薬併用trabeculectomyよりも合併症が少ないという点で優れており, 金属プローブを用いたtrabeculotomyよりも有効性が高いという点で優れていると考えられる. 発症から6年の眼症状を有する31歳男性ベーチェット病に平成17年9月右眼, 平成18年9月左眼にSL変法を施行したところ, 両眼とも特に合併症無く眼圧下降が得られた. SL変法はベーチェット病に伴う続発緑内障に対して有効な新しい手術療法であると考えられた.

# 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

分担研究者 太田 正穂 (信州大学医学部法医学教室)  
研究協力者 勝山 善彦 (信州大学附属病院薬剤部)  
伊藤亜紀子 (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)  
竹本 裕子 (北海道大学医学部視覚器病学)  
南場 研一 (北海道大学医学部視覚器病学)  
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では、臨床的治療薬としてシクロスポリン (CYA) が投与されている。しかし、この治療効果には個体差が見られることから、薬剤効果と遺伝学的要因の関連性が示唆される。平成17年度～18年度には薬物動態に関する薬物代謝酵素チトクロム P450の遺伝子多型と、薬物排出に関する ABC (ATP binding cassette; ATP 結合カセット) トランスポーター *MDR1* (Multidrug resistance), *MRP1* (Multidrug resistance protein), *MRP2/cMOAT* 遺伝子の遺伝子多型についてシクロスポリン感受性と相関が見られるか検討した。平成17年度はベーチェット病患者における CYA の効果と血中濃度との関係を検討するにあたり、*CYP3A4*, *CYP3A5*, *MDR1*, シクロフィリン A の遺伝子多型との相関について調べた。その結果 *MDR1* 遺伝子のプロモーター領域、エクソン21および26の SNPs (single nucleotide polymorphisms) が CYA の血中濃度  $AUC_{0-4}$  値と有意に相関していることが認められた。このことは CYA の吸収に関する個人差は *MDR1* 遺伝子多型と関連があると示唆された。平成18年度は、細胞内に取り込まれたシクロスポリンの動態に関する分子が薬剤効果に影響するか検討するために、シクロスポリン-シクロフィリン複合体の標的分子であるカルシニューリン (CnB) の多型とシクロスポリンの効果について検討した。解析にはシクロスポリンを投与した患者24人を対象とした。シクロスポリン投与後発作回数が半分以下となった症例を有効とした14人、無効例10人について、4種類の SNP について多型を検討したが、それぞれの SNP について有効例と無効例の間に有意差は認められなかった。しかし、ハプロタイプ解析において、AACA のハプロタイプの患者は有効例 5/14、無効例 0/10であり、有意差 ( $p=0.034$ ) が検出された。

## A. 研究目的

カルシニューリンを介したT細胞内 IL-2転写因子の活性化抑制作用を示すシクロスポリンは特異的かつ強力な免疫抑制作用を持つことから、臓器移植時、乾癬、ネフローゼ症候群、再生不良性貧血、ベーチェット病の臨床治療薬として利用されている。シクロスポリンによる治療効果には個人差が見られ、薬剤治療の有効性が一様でないことが問われている。この個人差をもたらす重要な要因の一つとしてシクロスポリンの薬物動態と薬物

感受性に関係する遺伝子の遺伝子多型の関与が示唆される。そこで、CYA の薬剤効果および血中濃度について *CYP3A4*, *CYP3A5*, *MDR1*, シクロフィリン A の遺伝子多型との相関を解析した。さらに、細胞内に取り込まれたシクロスポリンの動態に関する分子が薬剤効果に影響する因子があるか検討するために、CnB の遺伝的多型性との相関も解析した。CnB は CnA とヘテロ 2 量体をなし、細胞内でシクロスポリン-シクロフィリン複合体の標的分子であるカルシニューリン構成している。また、カルシニューリンの触媒部位の立体障

害をひきおこし競合的活性阻害を生じさせるのに一役を担う CnB 遺伝子多型と薬剤効果の解析は重要である。

## B. 研究方法

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、CYA を投与されている本病患者17人を対象とし、AUC0-4と C0, C1, C2, C3, C4の相関を検討した。

- ① CYA 有効群と無効群で AUC0-4および C2を解析し、これらの値と治療効果との関係を検討した。
- ② CYA の代謝に関与する CYP3A4や CYP3A5 遺伝子、吸収・排泄に関する MDR1遺伝子、CYA の標的分子であるシクロフィリン A (PPIA) 遺伝子について、各対立遺伝子 (アレル) を決定し、CYA 有効群、無効群で比較検討した。
- ③ CnB 内 SNPs については、CYA を投与されている本病患者24人を対象とした。その内、種々の事情によりシクロスポリン薬剤効果有効患者14人、無効患者10人について検討した。さらに、ベーチェット病患者群 (170人) と健常者群 (154人) との間における SNPs 多型遺伝子頻度分布の相違を検討した。
- ④ CnB は2p16-15に位置する PPP3R1遺伝子にコードされている。今回解析に用いた4種類の SNPs は、rs4671888 (イントロン1), rs2122127 (イントロン1), rs6546358 (イントロン6), rs1868402 (イントロン6) 内にあるものを使用した。

## C. 研究結果と考察

- ① AUC0-4と C2値が最も相関しており、相関係数は0.896であり、トラフ値よりも C2値の方が AUC0-4と相関していた。
- ② 有効性が評価された7例で、AUC0-4値および C0~C4の各値ともに CYA の有効性と有意な相関を示すものはなかった。
- ③ ベーチェット病患者の CYA 有効群と無効群で CYP3A4と CYP3A5遺伝子の多型性を検索したところ、CYP3A4遺伝子はすべて野生型 (CYP3A4\*1A)、CYP3A5遺伝子もほとんどすべてで野生型 (CYP3A5\*3) であり、両群間で相違はみられなかった。すなわち、CYP3A4や

CYP3A5遺伝子の個人差が CYA の有効性に直接関与している可能性は低いと考えられた。

- ④ MDR1遺伝子に関してその遺伝的多型性を調べてみたところ、プロモーター領域では、ハプロタイプ1/2, 2/4, 1/5で AUC0-4が低値であった。これらに共通の変異は -41a の変異であり、-41a の塩基が A→G へ置換されたアレルを有する患者では AUC0-4値が有意 (P=0.0002) に低く、CYA の吸収低下が示唆された (図1)。  
遺伝子領域の SNP では、エクソン26領域、3435番目の塩基が C→T へ置換されたアレルを有する患者では AUC0-4値が高い傾向にあり、CYA の吸収が増加していることが示唆された (図2)。MDR1遺伝子エクソン21領域、2677番目の変異では、G/G に対し T/T のタイプは有意に AUC0-4が高く、また、G を有するタイプ (G/G,G/T) に対し、有しないタイプ (A/A,T/T) は有意に AUC0-4が高かった (図2)。これらは既知の報告と同様であった。
- ⑤ MDR1遺伝子プロモーター領域の遺伝子頻度から約17%の患者がハプロタイプ2を有しており、AUC0-4値の測定が重要と考えられた (表1)
- ⑥ PPIA 遺伝子ではエクソン1の翻訳開始位置から下流10塩基目に多型性が検出されたが、CYA 有効群と無効群で有意差は認められなかった (表2)。PPIA 遺伝子の多型と治療効果は現時点では有意な相関が見られず、効果の程度などを加味して、他の SNP や対象患者数を増やしさらに検討する必要があると考えている。
- ⑦ 各 SNPs について、有効例と無効例におけるアレル頻度の比較の結果を表3に示した。いずれの SNPs においてもアレル保有率、アレル頻度で有意差を示すものは見られなかった。
- ⑧ 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4種類の SNPs (rs4671888,rs2122127, rs6546358, rs1868402) より有効群と無効群におけるハプロタイプ数を推定し、両群の頻度について  $\chi^2$  検定を行ったところ表4に示すように、CAAA ハプロタイプで有意差を確認した。
- ⑨ 患者群、健常者群について4種類の SNPs

(rs4671888,rs2122127, rs6546358, rs1868402) から Clark

⑩ アルゴリズムを用いてハプロタイプを推定すると、CGAA ハプロタイプが患者群において67.1%、健常者群において66.9%と最も多く、次にTAGGで51.2%と58.4%であった(表5)。ハプロタイプの頻度はベーチェット病患者群、健常者群において統計学的有意差は認められなかった。

平成17年度では、MDR1遺伝子に関してその遺伝的多型性を調べてみたところ、プロモーター領域の-41aの塩基がA→Gへ置換されたアリルを有する患者ではAUC0-4値が有意(P=0.0002)に低く、CYAの吸収低下が示唆された。

遺伝子領域のSNPでは、エクソン26領域、3435番目の塩基がC→Tへ置換されたアリルを有する患者ではAUC0-4値が高い傾向にあり、CYAの吸収が増加していることが示唆された。MDR1遺伝子エクソン21領域、2677番目の変異では、G/Gに対しT/Tのタイプは有意にAUC0-4が高く、また、Gを有するタイプ(G/G,G/GT)に対し、有しないタイプ(A/A,T/T)は有意にAUC0-4が高かった。これらは既知の報

告と同様であった。

シクロスポリンは細胞内に取り込まれた後、イムノフィリンと複合体をなしてCnBに結合し、カルシニューリンの触媒部分の立体障害を起こし、リンパ球の活性化を阻害することが知られている。平成18年度は、Ca<sup>++</sup>/カルモジュリン(CaM)依存性のセリン/スレオニン脱リン酸化酵素で、活性期をもつCnAと制御サブユニットであり、ヘテロ二重体蛋白を成しているCnBの遺伝子内多型とシクロスポリンの薬剤有効性について解析したが、明らかな有意差は認められなかった。しかし、一部のSNPsハプロタイプCAA(rs4671888,rs2122127, rs6546358, rs1868402)において例数は少ないが統計学的有意差を認めた。シクロスポリンやFK506はリンパ球の活性化に必須の役割を果たすカルシニューリンの阻害剤として反応し、免疫学的拒絶抑制に使われていることから更に例数を増やし、カルシニューリン遺伝子の遺伝的多型性とシクロスポリンの薬剤効果について検討する必要がある。

表1 ベーチェット病患者のMDR1遺伝子プロモーター領域の多型(N=34)

ハプロタイプ	N	遺伝子頻度
1	48	0.706
2	6	0.088
4	9	0.132
5	3	0.044
6	2	0.029

ハプロタイプ2を有していると考えられる患者は約17%

図1 MDR1遺伝子のプロモーター領域のSNPとシクロスポリンAUC0-4の関係

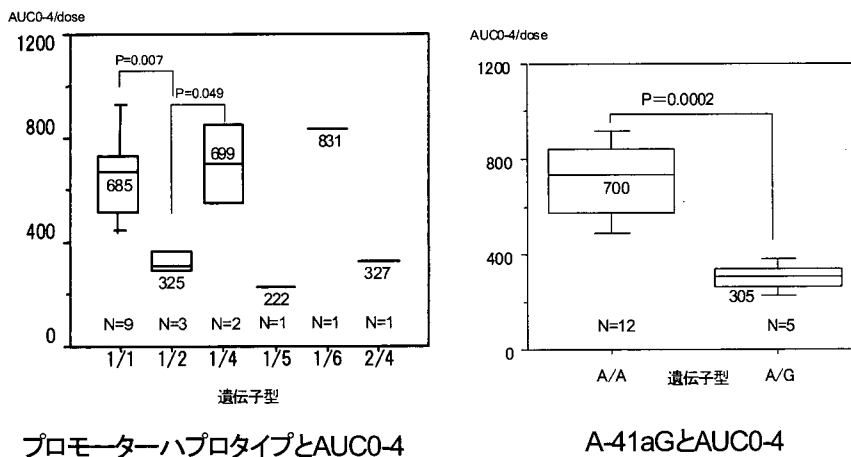


図2 MDR1遺伝子のエクソン領域の SNPとシクロスポリンAUC0-4の関係

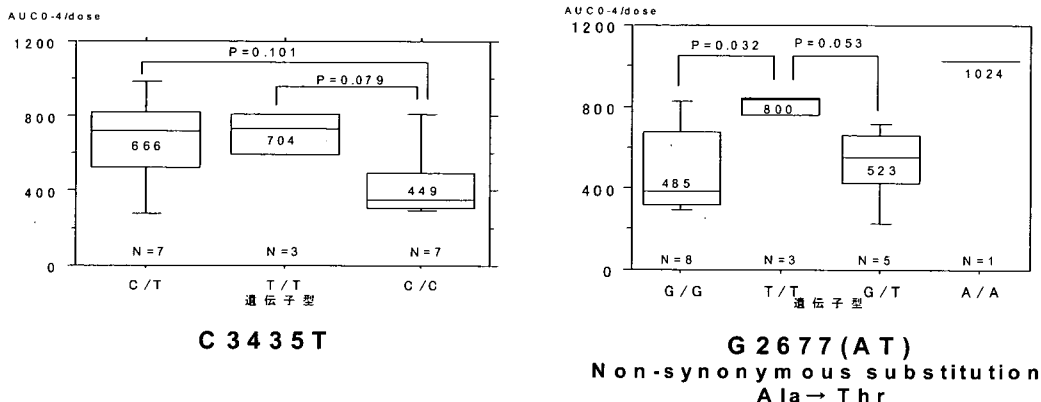


表2 ベーチェット病患者のPPIA遺伝子多型

患者	効果	AUC0-4	A-10G
B003	有効	4231	A/G
B008	有効	1463	G/G
B038	有効	2521	G/G
B250	有効	1637	G/G
B528	有効	2458	G/G
B530	有効	3579	A/G
B573	有効	1429	A/G
B305	無効	2253	A/A
B513	無効	1108	A/G
B521	無効	2528	G/G
B565	無効	1540	G/G

表3 シクロスポリン薬剤効果と SNP遺伝子頻度の比較

rs4671888					
	アレル頻度		遺伝子型		
	C	T	C/C	C/T	T/T
有効	16	12	4	8	2
無効	15	5	6	3	1
p	0.202		0.214	0.188	0.754
rs2122127					
	アレル頻度		遺伝子型		
	A	G	A/A	A/G	G/G
有効	18	10	6	6	2
無効	10	10	3	4	3
p	0.322		0.521	0.889	0.350
rs6546358					
	アレル頻度		遺伝子型		
	A	G	A/A	A/G	G/G
有効	15	13	4	7	3
無効	12	8	4	4	2
p	0.658		0.558	0.628	0.932
rs1868402					
	アレル頻度		遺伝子型		
	A	G	A/A	A/G	G/G
有効	15	13	4	7	3
無効	13	7	5	3	2
p	0.428		0.285	0.327	0.932

有効例:14人, 無効例:10人

表4 推定ハプロタイプの比較

ハプロタイプ	有効	無効	P
TAGG	10	4	0.124
CGAA	8	8	0.242
CAAA	5	0	0.034
CAGG	1	2	0.242
CAGA	0	1	0.124

rs4671888,rs2122127,rs6546358,rs1868402座のハプロタイプ

表5 患者・健常者群間における 推定ハプロタイプの比較

ハプロタイプ	患者群 (n=170)	健常者 (n=154)	P
CGAA	114	103	0.973
TAGG	87	90	0.190
CAAA	48	43	0.950
CAGG	19	17	0.969
CGAG	4	4	0.887
CAAG	3	0	0.098
CAGA	1	0	0.340

rs4671888,rs2122127,rs6546358,rs1868402座のハプロタイプ



# 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

分担研究者 太田 正穂（信州大学医学部法医学教室）  
研究協力者 勝山 善彦（信州大学附属病院薬剤部）  
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

ベーチェット病（BD）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。平成19年度は、ベーチェット病発症と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）遺伝子多型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) を用いて相関解析を行った。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  $\chi^2$  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が関わった複合性遺伝性疾患と考えられる。疾患発症に HLA-B51 対立遺伝子以外の内的遺伝因子の関与も示唆される。

本疾患の発症要因には病原体や微生物の関与が示唆されが、この病原体の生体侵入の感染防御において、主要な役割を果たす Toll-like receptor (TLR) TLR ファミリーがある。11種類報告されている特定のメンバーはウイルスや細菌の構成成分を認識している。平成19年度は、これら TLR ファミリーの TLR2, TLR4, TLR7, TLR9 の遺伝子多型とベーチェット病との疾患感受性について解析を試みた。

## B. 研究方法

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。

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。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

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 $\chi^2$ 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)。

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)。

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intron2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)。

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)。

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。

表1 TLR2遺伝子内SNPsとの相関

Name	dbSNP	Gene Location	AA change	Allele	Case	Control	$\chi^2$	P
SNP1	rs189830	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	rs380409	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
SNF5	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	Name	Allele	BD n=200	NC n=102	-O.R.	$\chi^2$	P
rs10759930	SNP1	T	239	138			
		C	161	66			
rs1927914	SNP2	A	240	138			
		G	160	66			
rs1927911	SNP3	G	248	137			
		A	152	67			
rs12377632	SNP4	C	246	139			
		T	154	65			
rs2149356	SNP5	C	248	139			
		T	152	65			
rs11536889	SNP6	G	316	151			
		C	84	53			
rs1554973	SNP7	T	352	184			
		C	48	20			
		A	304	172	0.59	5.59	0.0204
		G	96	32	1.7	5.59	0.0204
rs7037117	SNP8	A/A	113	74	0.49	7.38	0.0083
		A/G	78	24	2.08	7.23	0.0099
		G/G	9	4	1.15		
rs7045953	SNP9	A	362	189			
		G	38	15			

表3 TLR7遺伝子内SNPsとの相関(女性群対象)

dbSNP	Name	case	cont	RR	2	P
rs5935436	SNP1	C	84	53		
		T	5	8		
rs5741880	SNP2	G	84	53		
		T	5	8		
		C	82	53		
		G	9	15	0.31	6.66
rs5743733	SNP3	C/C	75	39	3.21	6.66
		C/G	7	14	0.26	7.89
		G/G	2	1		0.005
rs5743740	SNP4	A	84	52		
		G	23	15		
rs179016	SNP5	G	84	52		
		C	23	16		
rs1620233	SNP6	C	84	54		
		T	9	3		
rs179012	SNP7	G	84	53		
		A	16	14		
rs3853839	SNP10	G	39	22		
		A	81	49		

表4 TLR9遺伝子内SNPとの相関

Name	SNP rs	Allele	Case n=200	Control n=102	P
SNP1	rs187084	A	141	75	
		G	151	73	NS
SNP2	rs5743836	T	200	102	
		C	0	3	NS
SNP3	rs5743841	C	200	102	
		T	0	0	NS
SNP4	rs352139	T	141	76	
		C	150	72	NS
SNP5	rs5743842	C	200	102	
		T	0	0	NS
SNP6	rs5743843	C	200	102	
		A	0	0	NS
SNP7	rs352140	T	150	71	
		C	109	55	NS
SNP8	rs5743845	C	200	102	
		T	1	3	NS
SNP9	rs5743846	C	200	102	
		T	0	0	NS

# 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 Streptococcus Sanguinis に対する反応性

分担研究者 金子 史男 (福島県立医科大学医学部皮膚科学教室教授)

共同研究者 柳堀 浩克 (福島県立医科大学皮膚科学講座)

岡田 智子 (福島県立医科大学皮膚科学講座)

尾山 徳孝 (福島県立医科大学皮膚科学講座)

中村晃一郎 (福島県立医科大学皮膚科学講座)

西田 朋美 (横浜市立大学医学部眼科)

水木 信久 (横浜市立大学医学部眼科)

## 研究要旨

ベーチェット病 (BD) における慢性炎症に Th1型サイトカインが重要な役割を果たしているが、その病因については明らかにされていない。今回我々は IL12p40プロモーター領域の遺伝子多型について解析と、これらそれぞれのゲノタイプにおける LPS, あるいは Streptococcus Sanguinis (S.Sanguinis) の反応性を解析した。これまで、IL-12B プロモーター領域に4bp の挿入がヘテロ接合体で存在すると、IL12p40の産生量が減少すると報告されている。今回の研究では BD 患者92名、健常人102名より genomic DNA を抽出し IL12p40プロモーター領域を PCR にて増幅した後、電気泳動にて4bp 挿入の有無を確認したところ、ヘテロ群では BD 患者53.3%、健常人38.2%ホモ群では BD 患者46.7%、健常人61.8%で、BD 群で有意にヘテロの増加を認めた。さらに、IL12p40, p70の産生量を比較するため、BD 患者と健常人の末梢血単核球を分離し、LPS または S.Sanguinis の菌体タンパクと培養し ELISA 法と半定量的 RT-PCR 法にて濃度を比較検討したところ、BD 群のうちヘテロ群で、健常人群、BD ホモ群と比較して、S.Sanguinis 菌体タンパクと強い反応性を認めた。

## A. 背景

BD と IL-12 に関して、活動期の BD では Th1型サイトカインである IFN  $\gamma$ 、IL12の産生量が増加している報告や、病勢に応じて Th1と Th2のバランスが変化すると報告されている。BD の病態には種々の細胞性免疫機序が関与すると考えられており、特に Th1型サイトカインの産生調節を行う IL12が病態に深く関与していると思われる (図1)。これまで我々は、IL12p40 untranslated region (UTR) の SNP 解析を行ない BD 群と健常人群で有意差を得なかった<sup>1</sup>。また、今までの報告では IL12p40プロモーター領域に4bp 塩基の挿入がヘテロでみられると IL12の産生量が低下するとの報告があり、喘息<sup>2</sup>や乾癬<sup>3</sup>については解析が行なわれているものの、BD ではいまだ解析されていない。

## B. 研究目的

Th1優位型の疾患で重要な役割を果たしている IL12について BD 患者における遺伝子学的検討を行う事を目的として、これまでの報告をもとに IL-12 p40プロモーター領域の多型解析 (図2)、を行った。また、それぞれの genotype ごとのリポポリサッカライド (LPS)、あるいは S.Sanguinis 抗原との反応性を調べた。

## C. 方法

BD 患者92名、正常人102名より genomic DNA を抽出し IL12p40プロモーター領域を PCR にて増幅した後、電気泳動にて4bp 挿入の有無を確認し (図3)、これらの結果を、HLA-B51の有無、病型で分別して統計学的に解析を行なった。次に、BD 患者 (n=8) と健常人 (n=9) の末梢血単

核球 (PBMC) を分離し, LPS または S.Sanguinis の菌体タンパクと 1, 5, 7 日間培養した後, 培養上清中の IL12p40, p70 を ELISA 法で測定した. また PBMC から mRNA を抽出し半定量的 RT-PCR 法にて濃度を比較検討した (図 4).

## D. 結 果

BD 患者で 4bp 挿入 homo:42 (48.3%), hetero45 (51.7%), 健常人コントロールでは homo 63 (61.8%), hetero 39 (38.2%) で ( $p=0.036$ ), さらに HLA-B51 の有無で分けてみると BD においては HLA-B51+ /homo30 例, HLA-B51- /homo12 例, HLA-B51+ /hetero19 例, HLA-B51- /hetero 26 例であり, これらの結果を Fisher's exact test で統計処理したところ, 有意差を認めた (図 5). また genotype ごとの S.Sanguinis 抗原との反応性ではヘテロ接合体を持つ BD 群で有意に IL12p40, p70 の産生量が他の群と比較し増加していた (図 6). 一方 LPS 刺激群ではそれぞれの群間において有意差を認めなかった. 半定量的 RT-PCR 法においても S.Sanguinis 抗原刺激下で, ヘテロ接合体を持つ BD 群の IL12p40mRNA 発現量増加を認めた (図 7).

## E. 考 按

今回の研究では IL-12 p40 プロモーター領域において BD 群と健常人群で有意差を認めた. さらに IL-12p40 プロモーターのヘテロ群において, S. Sanguinis 刺激下で IL12p40, p70 の産生量増加を認め, BD における Th1 型優位な免疫反応には IL-12p40 プロモーターの遺伝子多型を背景とした常在細菌抗原に対する免疫応答が関与していることが示唆された.

## F. 研究発表

ベーチェット病に関する調査研究 平成17年度第2回研究会 (H17. 12. 9 福島)

## G. 文 献

1) Yanagihori H, Tojo M, Inoue T, Nakamura K, Kaneko F, Nishida T, Mizuki N. Lack of association of interleukin-12 p40 gene (IL12B) polymorphism with Behcet's disease in the Japanese population. J

Dermatol Sci. 2004 Apr; 34 (2):112-4.

2) Morahan G, Huang D, Wu M, Holt BJ, White GP, Kendall GE, Sly PD, Holt PG. Association of IL12B promoter polymorphism with severity of atopic and non-atopic asthma in children. Lancet. 2002 Aug 10;360 (9331):455-9.

3) Litjens NH, van der Plas MJ, Ravensbergen B, Numan-Ruberg SC, et al. Psoriasis is not associated with IL-12p70/IL-12p40 production and IL12B promoter polymorphism. J Invest Dermatol. 2004 Apr;122 (4):923-6.

## 図の説明

図 1. これまでに報告のあった BD と IL12 に関する報告

図 2. IL-12 p40 プロモーター領域多型領域についての説明

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

図 4. 方法: IL12p40, p70 の産生量の測定方法

図 5. 結果: BD 群と正常人群で有意差を認める.

図 6. 結果: S.Sanguinis 抗原刺激下で, ヘテロ接合体を持つ BD 群で有意に IL12p40, p70 の産生量が他の群と比較し増加している.

図 7. 結果: S.Sanguinis 抗原刺激下で, ヘテロ接合体を持つ BD 群で有意に IL12p40, p70 の mRNA 発現量が他の群と比較し増加している.

図1 Behcet 病における T細胞免疫異常

- Th1 polarization of the immune response in Behcet disease  
Frassanoto MA et al. Arthritis Rheum (1999)
- Systemic levels of the T cell regulatory cytokines IL-10 and IL-12 in Behcet's disease ; soluble TNFR-75 as a biological marker of disease activity  
Turan B et al. J Rheumatol (1997)
- Divergent cytokine production profile in Behcet's disease. Altered Th1/Th2 cell cytokine pattern  
Raziuddin S et al. J Rheumatol (1998)

図2 IL-12 p40 promoter 領域についての報告

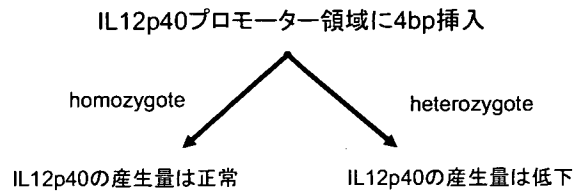


図3 方法

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

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

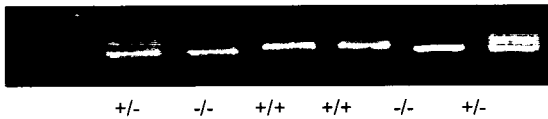


図4 方法

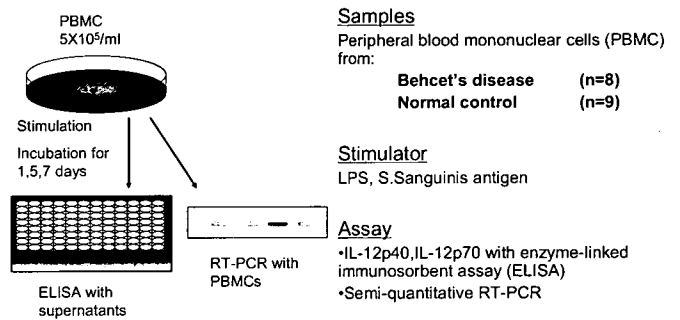


図5 結果

IL12p40 promoter

Genotype	BD(n=92)			Control(n=102)		
	HLA-B51 <sup>+</sup>	HLA-B51 <sup>-</sup>	Total	HLA-B51 <sup>+</sup>	HLA-B51 <sup>-</sup>	Total
Homo (++ or --)	30	13	43 (46.7)	10	53	63 (61.8)
Hetero (+/-)	20	29	49 (53.3)	3	36	39 (38.2)

p=0.036

Genotype	BD(n=92)	Control(n=102)
++	13(14.1)	19(18.6)
+-	49(53.3)	39(38.2)
--	30(32.6)	44(43.1)

p>0.05  
The numbers in parentheses indicate the percentage

図6 結果

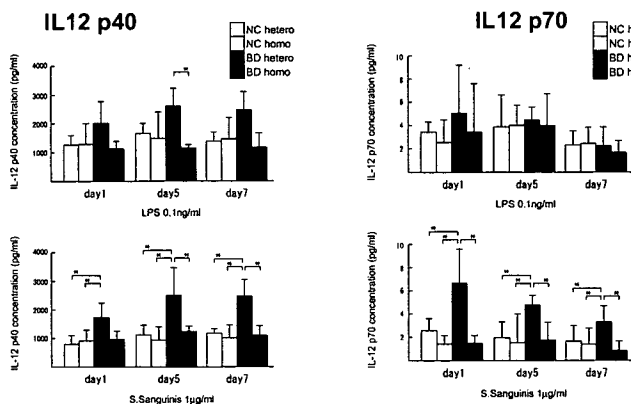
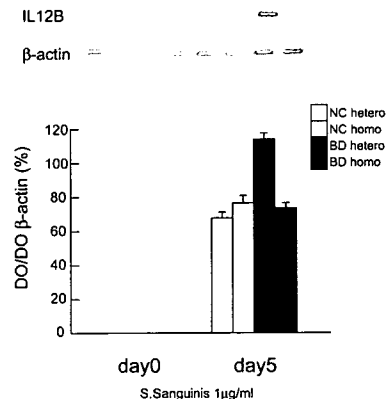


図7 結果



# 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した。その結果、PBMC の HO-1mRNA 発現は健常コントロールと比較して BD の活動期に低下し、TLR4 mRNA 発現は BD の疾患活動性を問わず PBMC、PMN で亢進していた。また、PBMC の LPS 刺激による HO-1発現は TLR4 発現量と負の相関を示した。以上の結果より、BD 白血球では HO-1発現低下が炎症制御不全を引き起こしている可能性がある。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 (BD) の病因として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。一方では、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、それらが BD の病態に関わる可能性も指摘される。

本研究では私たちが研究してきた抗炎症蛋白 heme oxygenase-1 (HO-1) と BD との関連、特に自然免疫系の主要な役割を担う TLR との関連について解析した。

## 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 $47.7 \pm 15.0$ 才)。健常コントロール30名。  
(倫理面への配慮)

すべての対象者より研究目的、使用法を説明し、文書同意を得た上で採血を行なった。

2. 白血球の mRNA 発現解析：末梢血より分離した (PBMC)、多核白血球 (PMN) から AGPC 法にて RNA を抽出し、HO-1, TLR2, TLR4 の mRNA は TaqMan の real-time PCR 法を用い半定量的に解析した。
3. HO-1蛋白発現解析：細胞抽出蛋白について抗 HO-1抗体を用いた免疫ブロッティング法により解析した。

## C. 研究結果

1. HO-1mRNA 発現量は病型、治療薬に関係なく、健常者と比較し、BD の活動期に有意に低下し (図1)、PMN もその傾向にあった (図2)。
2. TLR2については PBMC、PMN とともに BD 患者、健常者では差異はなかった。TLR4では患者 PBMC で活動性のいかんによらず亢進し、PMN でもその傾向がみられた (図3)。
3. BD 患者 PBMC において、TLR4と HO-1の mRNA 発現量は負の相関を示した。
4. PBMC を TLR4のリガンドである LPS で刺激

すると、HO-1蛋白発現の減少を認めるが、BD患者PBMCにおいて、LPS刺激によるHO-1発現量はTLR4発現量と負の相関を示した。

5. HO-1発現ベクターによりPBMCにHO-1を強制発現させてもTLR2, TLR4の発現には変化なかった。

## D. 考 察

BD患者の活動期白血球に抗炎症作用を持つHO-1発現の低下が認められ、それらがBDの病態形成に関与している可能性が示唆された。さらに、BD患者では恒常的なTLR4発現亢進があり、活動期に何らかのリガンドが作用し、HO-1発現をさらに低下させ、炎症制御不全を生じる可能性が示された。これらの結果から、その機序の是正はBDの新たな治療法の開発につながる可能性がある。

## E. 結 論

BD白血球ではTLR4発現亢進がHO-1の発現低下を招き、炎症病態を促進させている可能性がある。

## 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, Ishigatsubo Y et al. Increased serum HO-1 in hemophagocytic syndrome and adult-onset Still's disease: use in the differential diagnosis of hyperferritinemia. *Arthritis Res Ther.*7(3):616-24, 2005
2. Shinohara T, Kaneko T, Nagashima Y, Ueda A, Tagawa A, Ishigatsubo Y. : Adenovirus-mediated transfer and overexpression of heme oxygenase 1 cDNA in lungs attenuates elastase-induced pulmonary emphysema in mice. *Hum Gene Ther.* 2005 ;16(3): 318-27, 2005
3. 桐野洋平, 岳野光洋, 小林秀郎, 石ヶ坪良明: 炎症性疾患における Heme oxygenase-1 (HO-1) の発現. *炎症・再生*25: 431-435, 2005
4. 石ヶ坪良明, 岳野光洋: 「膠原病と血栓」膠

原病の病態への血栓の関与 ベーチェット病  
血栓と循環 13: 395-399.2005

5. 岳野光洋, 石ヶ坪良明: Behcet 病におけるヘムオキシゲナーゼ1の役割. *医学のあゆみ*215: 33-37, 2005
6. Takeno M, Ishigatsubo Y. : Behcet's disease and familial Mediterranean fever. *Intern Med.* 2006;45(13): (805-6)
7. Kobayashi H, Takeno M, Saito T, Takeda Y, Kirino Y, Noyori K, Hayashi T, Ueda A, Ishigatsubo, Y. Regulatory role of heme oxygenase 1 in inflammation of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 54:1132-1142, 2006
8. Sato T, Takeno M, Honma K, Yamauchi H, Saito Y, Sasaki T, Morikubo H, Nagashima Y, Takagi S, Yamanaka K, Kaneko T, Ishigatsubo Y. Heme Oxygenase-1, a Potential Biomarker of Chronic Silicosis, Attenuates Silica-induced Lung Injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 174(8):906-14, 2006
9. 石ヶ坪良明: Heme oxygenase-1(HO-1)と炎症性疾患. *リウマチ科*, 2006 35巻1号 (52-57)
10. 桐野洋平, 岳野光洋, 石ヶ坪良明: 血球貪食症候群および成人 Still 病における血清 heme oxygenase-1 (HO-1) の高発現の意義. *臨床免疫* 45(1): 75-78, 2006
11. Kirino Y, Takeno M, Murakami S, Kobayashi M, Kobayashi H, Miura K, Ideguchi H, Ohno S, Ueda A, Ishigatsubo Y, Tumor necrosis factor-alpha acceleration of inflammatory responses by down regulating heme oxygenase-1 in human peripheral monocytes. *Arthritis Rheum.* 56: 464-475, 2007.  
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

### 2. 学会発表

1. Ishigatsubo Y, Murakami S, Takeno M, Watanabe R, Kirino Y, Kobayashi M, Ohno S, Kudo M, Watanuki Y, Hasumi Y, Mizuki N: Monitoring of tuberculosis during anti-TNF therapy by using ELISPOT technique. XII International Behcet Disease Conference, Lisbon, 2006, Sep.
2. Takeno M, Kirino Y, Murakami S, Watanabe R, Kobayashi M, Hasumi Y, Mizuki N, Ishigatsubo Y. Reduced HO-1 expression are involved in



inflammation of Behcet disease. XII I International Behcet Disease Conference, Lisbon, Portugal, 2006, Sep

3. Takeno M, Kirino Y, Murakami S, Watanabe R, Kobayashi M, Hasumi Y, Mizuki N, Ishigastubo Y. Increased Expression of TLR 4 Associated with Reduced HO-1 Accelerates Inflammatory Responses in Behcet disease Washington DC, 2006, 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

1.  
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願，登録状況  
特になし

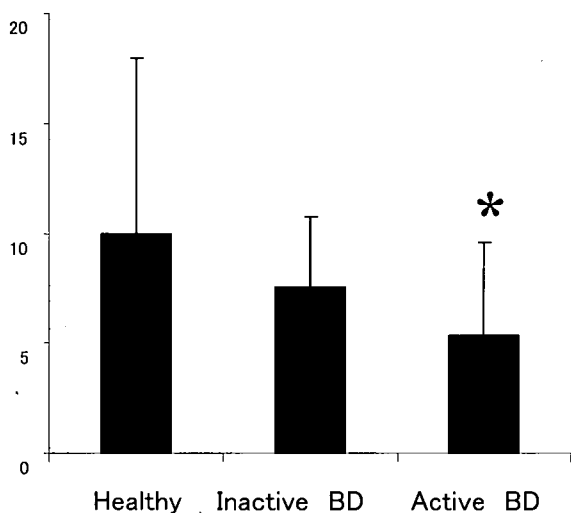


図1. ベーチェット病 (BD) 患者及び健常人 PBMC における HO-1 mRNA 発現 P < 0.05 vs healthy controls

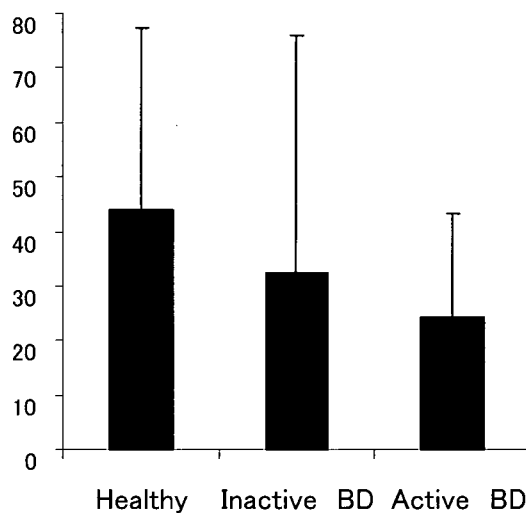


図2. ベーチェット病 (BD) 患者及び健常人 PMN における HO-1 mRNA 発現

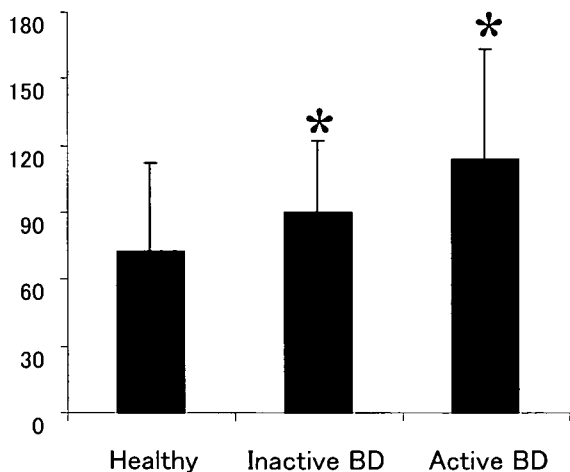


図3. ベーチェット病 (BD) 患者及び健常人 PBMC における TLR4 mRNA 発現 P < 0.05 vs healthy controls

# ペ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

分担研究者 小熊 恵二（岡山大学大学院医歯薬総合研究科病原細菌学教室）  
研究協力者 申 蓮花（岡山大学大学院医歯薬総合研究科病原細菌学教室）  
横田 憲治（岡山大学医学部保健学科）

## 研究要旨

ペーチェット病患者より分離した *Streptococcus sanguinis* 113-20株は、ヒト好中球を活性化し、末梢血単核球からの IL8産生を強く誘導する事を報告してきた。これまでこの菌の HSP60をクローニングし、そのアミノ酸配列から、HLA-classII 分子にのり、T細胞を活性化しやすい配列（T cell epitope）を含む人工合成ペプチドを作製した。このペプチドのマクロファージに対する作用を検討したところ、ある1つのペプチドは菌の *Streptococcus* 抗原刺激による IL8産生を抑制することを見出した。この現象に関わる遺伝子の発現を cDNA チップで解析したところ、FK506 binding protein が関係している事が予測された。また113-20株の IL8産生誘導には phosphocarrier protein (HPr) が関係していることが判明した。

## A. 研究目的

ペーチェット病は、外来微生物に対する免疫反応が、病態形成に関与している事が推察されてきた。我々は、外来抗原の1つとして、ペーチェット病患者口腔内より分離した *Streptococcus* (113-20株) と患者の免疫反応について報告してきた。この菌は、末梢血の好中球を強く活性化し、また単核球からの pro-inflammatory cytokine である IL8や T helper 1 (Th1) を誘導するサイトカインである IL12の産生を強く誘導した。一方、細菌の熱ショック蛋白 (HSP) が、ペーチェット病の免疫反応に関係しているとの報告があり、この113-20株の HSP60kDa をクローニングし、リコンビナント蛋白を作製した。さらに、このタンパク質のアミノ酸配列から、免疫原性の強いと考えられる HLA-classII 分子にのり、T細胞を活性化しやすい配列（T cell epitope）を含む人工合成ペプチドを作製した。これらの菌の抗原及び HSP 抗原を、マクロファージ培養株である NOMO1と U937細胞に作用させ、免疫系細胞に対する作用を検討した。

## B. 研究方法

### 1) 抗原の作製

*Streptococcus* 113-20株を Todd-Hewitt 培地で18時間培養後、遠心で集菌した。上清は飽和硫酸で塩析し、PBS で透析した。菌体は、滅菌蒸留水に懸濁し、超音波破碎した。破碎した抗原を 20,000xg, 30分遠心し上清（細胞可溶化成分）を得た。HSP60は、PCR で増幅した113-20株遺伝子を、GST-fusion 蛋白として大腸菌で発現させた。ペプチドは113-20株のアミノ酸配列より、HLA-classII 分子にのり、T細胞を活性化しやすい配列（T cell epitope）を含む人工合成ペプチドを6本作製した。（表1）

### 2) 培養細胞

マクロファージ系の細胞 NOMO1及び U937を 10% FCS 加 RPMI1640で培養した。抗原刺激した上清、細胞ともに -80℃で測定まで保存した。

### 3) サイトカインの測定

培養上清中の IL8及び TNF- $\alpha$ の測定は、TECHNE Co のキットで測定した。

### 4) cDNA チップ

NOMO1細胞を113-20株の細胞破碎抗原と HSP60のペプチド (LO1) で刺激し、mRNA を抽出し、Human Genome U133 Plus 2.0 Array (約 47,000の転写産物 / 約54,000のプローブセット U133A + U133B + 約6500遺伝子からなる。) で解析した。

5) ペーチェット株113-20より IL8産生誘導にかかわるタンパク質を、細胞可溶化成分を40%硫酸で塩析し、その後、陽イオン交換カラムで精製した。

#### (倫理面への配慮)

実験自体は、臨床検体を用いていない。

### C. 研究結果

#### 1) 菌体抗原による IL8の産生

菌体(菌を熱で不活化した抗原)、分泌タンパク質(培養上清)、細胞可溶化成分で、NOMO1細胞を刺激し、IL8の産生を見た(図1)。菌体、細胞可溶化成分は、マクロファージからの強いIL8誘導活性を示した。

#### 2) HSP60ペプチド

113-20細胞可溶化抗原刺激による、IL8産生は、LO1及びUKの添加により抑制された(図2)。しかしTNF産生においては、LO1のみが軽い抑制効果が認められたが、ほとんど影響が無かった。

#### 3) cDNA チップ

NOMO1細胞に113-20可溶化抗原を作用させた時と、更にHSPペプチド(LO1)を作用させた場合で、mRNAの発現を検討した。113-20による抗原刺激により、免疫反応に関係したケモカイン「chemokine (C-C motif) ligand 20 aquaporin 9, chemokine (C-X-C motif) ligand 2」やサイトカイン(interleukin 1, beta, TNF receptor-associated factor 1, tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6, interleukin 10, interleukin 12B (natural killer cell stimulatory factor 2, cytotoxic lymphocyte maturation factor 2, p40), interleukin 1, alpha, Interleukin 7 receptor, interleukin 1, beta) 関連遺伝子の発現上昇が認められた。さらにこの系にHSPペプチドLO1を作用させると、「IL16 (CD4細胞遊走活性), IL13 receptor alpha (IL13はMHC classII, Mφ遊走活性), IL17 receptor (IL17は活性化メモリーCD4細胞より出される炎症性サイトカイン)」等のメッセンジャーの発現が減少していた。またペプチド添加により何らかの細胞表面レセプターを介してサイトカインの抑制がかかると考え、細胞表面レセプター関係のmRNAを検索したところ、CD58とFK506 binding proteinが関係している事が示唆された。

4) 菌体成分から精製されたIL8を誘導するタンパク質(図3)はアミノ酸配列の分析から phosphocarrier protein HPrであり、このタンパク質は菌体外にも分泌されていることが判明した。

### D. 考 察

これまで、ペーチェット病患者の口腔内から分離した *Streptococcus*113-20株が、患者リンパ球や、マクロファージ系細胞からの炎症性サイトカイン産生を誘導する事を報告してきた。この産生誘導には、菌のタンパク質であるHPrが関係していることが判明した。さらに、HSPペプチドには、*Streptococcus* 113-20株抗原刺激によるマクロファージからのサイトカイン産生の抑制効果がある事が判明した。このようにHSPは、宿主免疫反応に対して多様な作用がある事が推察され、将来的には、これを利用したペーチェット病患者の免疫寛容の誘導等の治療に応用できる可能性が示唆された。

### E. 結 論

以下の2点が明らかになった。

- ① *Streptococcus* のHSPは、多彩な免疫活性があり、特にHSPペプチドは、免疫抑制効果があることが、また、この効果は宿主細胞のFK506 binding proteinが関係している。
- ② 113-20株のIL8産生誘導には、菌体の phosphocarrier protein HPrが関係している。

### 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

1. 申蓮花, 横田憲治, 綾田潔, 阪口義彦, 岡田智行, 趙瑩, 藤本聖人, 小熊恵二. ペーチェット病における炎症に関与している細菌抗原の解析. 第59回日本細菌学会中四国支部総会(平成18年10月18~19日, 宇部)
2. ペーチェット病における炎症に関与している細菌抗原の解析 申蓮花, 横田憲治, 綾田潔,

阪口義彦, 平井一行, 長町栄子, 小熊恵二, 第  
80回日本細菌学会総会 2007年3月25~28日  
大阪市

3. ペーチェット患者由来 Streptococcus の免疫  
活性化抗原の精製 申蓮花, 横田憲治, 綾田潔,  
阪口義彦, 平井一行, 誉田智, 山側佐智, 小熊  
恵二 第60回日本細菌学会中四国支部総会  
2007年10月13~14日 岡山

#### H. 知的財産権の出願, 登録状況

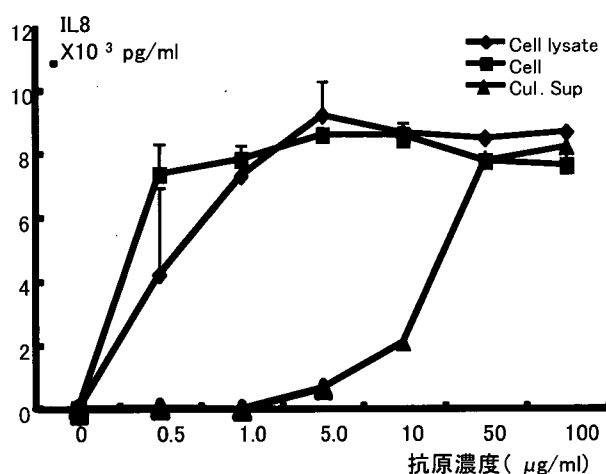
1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他  
特記事項なし

表1 HSP60合成ペプチド

名称	Location	Sequence
LO1	249-264	ADDVD <u>GEAL</u> PTLVLNK
UK	311-326	TIEALGQAARVTVDKD
IIIa	365-384	ERLAKLSGGVAVIKVGAATE
IIIb	395-413	EDALNATRAAVEEGIVAGG
LO2	480-499	GEWVNMIEEGIIDPVKVSRS
LO3	504-518	AASVASLILTTEAVV

Location; N- 末からの番号  
Sequence; 太字はヒトの HSP60と共通なアミノ酸,  
下線は T cell epitope

図1 113-20株抗原刺激による NOMO1からの IL8産生



Cell : 菌体 (菌を熱で不活化した抗原), Cell lysate : 細胞  
可溶化成分, Cul. Sup ; 分泌蛋白

図2 HSP ペプチドによる IL8産生抑制

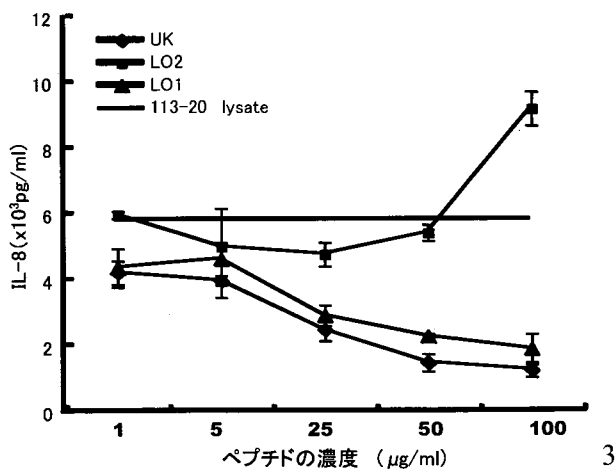


図3 IL8産生誘導タンパク HPR の精製

