

厚生労働科学研究費補助金

感覚器障害研究事業

正常眼圧緑内障の疾患感受性遺伝子の同定
および迅速遺伝子診断キットの開発に
関する研究

平成18年度～20年度 総合研究報告書

主任研究者 水木 信久

平成21（2009）年 4月

目次

I. 総合研究報告

正常眼圧緑内障の疾患感受性遺伝子の同定および迅速遺伝子診断
キットの開発に関する研究

水木 信久 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 12

III. 研究成果の刊行物・別刷 14

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）
総括研究報告書

正常眼圧緑内障の疾患感受性遺伝子の同定および
迅速遺伝子診断キットの開発に関する研究

研究代表者 水木 信久 横浜市立大学医学部眼科学 教授

研究要旨 緑内障は視神経に傷害をきたす進行性の難治性疾患であり、本邦の失明原因の第一位を占める。その有病率は加齢とともに上昇し、40歳以上では5.8%（推定250万人）と高値を示す。緑内障は複数の危険因子（疾患感受性遺伝子）の関与のもとに発症する多因子性遺伝疾患であると考えられており、これらの遺伝情報は疾患罹患率の予測や予防法の確立、疾患感受性遺伝子をターゲットとした新薬の開発を可能にすると考えられる。本研究の目的は本邦に最も多い正常眼圧緑内障（normal tension glaucoma: NTG）の疾患感受性遺伝子を網羅的に同定し、NTGの迅速遺伝子診断キットおよびゲノム創薬の開発を行うことである。遺伝マーカーとしてマイクロサテライトおよびSNPを用いた全ゲノム網羅的解析（genomewide approach）および候補遺伝子解析（candidate gene approach）によりNTGの疾患感受性遺伝子の網羅的なスクリーニングを行う。その後、得られた遺伝情報をもとにNTGの迅速遺伝子診断キットおよびゲノム創薬の開発を試みる。

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）
太田正穂（信州大学医学部法医学 講師）
伊藤典彦（横浜市立大学医学部眼科学 助教）
西出忠之（横浜市立大学医学部眼科学 助教）
上本理世（横浜市立大学医学部眼科学 助教）

A. 研究目的

緑内障は視神経に傷害をきたす進行性の難治性疾患である。放置すると視野狭窄が進行し、失明に至ることのある疾患で、本邦の失明原因の第1位を占めている。緑内障で失った視野（死んだ細胞）は回復することはないため、その治療の基本は進行予防、進行抑制であり、早期発見、早期治療が非常に重要である。緑内障は正常視機能を維持できる健康眼圧以上の眼圧上昇のために、視神経が圧迫され、視野狭窄が生じると考えられており、眼圧の上昇が緑内障診断の重要な基準となっている。しかしながら、眼圧が正常範囲にあるにも関わらず、視野狭窄を来す正常眼圧緑内障（normal tension glaucoma: NTG）というタイプが存在し、本邦ではそのNTGが全緑内障患者の約80%と最も高頻度に存在することが知られている（2002年多治見スタディ）。NTGは眼圧が正常範囲にあるため、健康診断や通常の眼科の診察では見落とされることも少なくない。また、NTGは本人の自覚症状も少なく、本人が気付かないうちに視神経傷害（視野障害）が進行していることも多

いため、NTGの早期発見、早期治療が大切とされている。NTGは危険因子（疾患感受性遺伝子）が多数重なることにより発症する多因子疾患であると考えられている。したがって、NTGの感受性遺伝子を同定し、NTGの迅速な遺伝子診断法を確立することは、患者本人にとっても私たち医療従事者にとっても大変意義のあることである。

本研究課題では、遺伝マーカーとしてマイクロサテライト（MS）およびSNPの両者を用いて、NTGの疾患感受性遺伝子および疾患特異的変異の網羅的な同定を目指している。その後、得られた遺伝情報をもとにNTGの迅速遺伝子診断キットおよびゲノム創薬の開発を試みる。

B. 研究方法

1) NTGクライテリアの確立と迅速かつ品質を維持した検体収集ネットワークの構築

NTGは多因子疾患と考えられており、その発症にはさまざまな要因（遺伝要因および環境要因）が関与していることが示唆される。本研究の目的は、遺伝要因が強く関与しているNTGのみを抽出してその疾患感受性遺伝子を同定することであり、通常のNTGの診断基準（クライテリア）よりも厳しいクライテリアを課して、より純粋な遺伝子疾患としてのNTGを選択する必要がある。本課題では、日本緑内障学会・データ解析委員会の協力を得て、より厳格なNTGのクライテリアを作成する。

また、ゲノム解析の精度向上を図るため、解析に用いるゲノムDNAの高品質を確保するシステ

ムの検討を行う。

2) MS を用いた疾患感受性遺伝子同定法の確立

全ゲノムを網羅する 3 万個 (1 個/100kb の密度) のマイクロサテライトを収集し、多型に富んだ遺伝子マーカーの設定を行う。さらに本研究では、遺伝子スクリーニングのより効率化を図るため、多型マイクロサテライトマーカーのプレートセット化および複数人のゲノム DNA を混合して用いる Pooled DNA 法の確立を行い、マイクロサテライトを用いたゲノムワイドな高速タイピング系を構築する。

3) ゲノムワイドな MS による相関解析を用いた NTG の感受性遺伝子の検索

2) より収集した全ゲノムを網羅する多型性豊富な約 3 万個の 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、NTG の疾患感受性遺伝子の同定を行う。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。

横浜市立大学ほか共同研究医療機関にて厳密なクライテリアのもとに NTG と診断された患者を対象に、末梢から 20ml を採血する。DNA 抽出キット (QIAamp DNA Blood Maxi Kit) を用いてゲノム DNA を精製し、MS スクリーニングに用いる。DNA 濃度を定量し、各個人の DNA 量が均一になるように 100~200 サンプルを混合・調整して pooled DNA を作成する。pooled DNA を鋳型として 23,465 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 3730 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 スクリーニングでは、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。

4) DNA チップによる NTG 感受性遺伝子の全ゲノム網羅的解析

疾患感受性遺伝子のスクリーニング法として Affymetrix 社 GeneChip の Human Mapping 500k Array set (500,568 個の SNP) を用いた SNP 解析を行った。Gene Chip の Mapping 500k Array set は 2 枚の高密度オリゴヌクレオチドアレイ (250k Array)、NspI と StyI からなり、各アレイは平均 25 万 SNP をジェノタイピングすることが可能である。Mapping 500k set の全ての SNP は厳密なスクリーニングと評価実験を受けている。1 度の実験で 50 万以上の SNP のジェノタイピングを行えることから、全ゲノムの網羅的な解析ツールとして有用である。

横浜市立大学ほか共同研究医療機関において年齢、眼圧、屈折異常など厳密なクライテリアを満たした NTG 患者サンプルを収集した。QIAamp DNA Blood Maxi Kit を用いて DNA を抽出した。DNA チップの解析方法は Affymetrix 社のプロトコルの準拠して行った。まず、PicoGreen 定量キット (PicoGreen ds DNA Quantification Reagent and Kit 200-2000 assay) を用いて DNA 濃度を定量し、各サンプルの DNA 濃度が 250/50 μ l になるように調製した。その後、全ゲノムを制限酵素で切断し、4 塩基の特異的突出末端を認識するアダプターをライゲーションした。アダプターを付加した DNA 断片を PCR で増幅し、フラグメント化して標識した後、Mapping 250k Array にハイブリダイゼーションさせた。蛍光で染色し、レーザーキャプチャーで各プローブの蛍光強度から各 SNP の対立遺伝子を Direct Model (DM) Algorithm (DM アルゴリズム) を用いて解析を行った。得られた結果から SNP ごとに患者群と健常群の対立遺伝子分布を統計的に解析し、疾患と相関する遺伝子の決定を行う。統計解析の対象となる SNP はハーディ・ワインバーグ平衡 ($P < 0.001$) にあり、call rate (解析が適切に行われた SNP の割合) が 95% 以上でマイナーアレル頻度が 5% 以上の SNP とした (クオリティーチェック)。実験精度とコンタミネーションの評価は modified partitioning around methods (MPAM) algorithm (MPAM アルゴリズム) にて行った。

5) NTG 発症に関わる候補遺伝子の多型解析

「候補遺伝子解析 (candidate gene approach)」とは疾患でみられる機能異常などから候補となり得る遺伝子や遺伝子領域をあらかじめ選択して解析を行う手法である。本研究では全ゲノム網羅的解析による疾患感受性遺伝子の同定と並行して、疾患感受性候補となり得る複数の遺伝子および遺伝

子領域を対象に MS および SNP を用いて相関解析を行う。

6) NTG 迅速遺伝子診断キットの開発に関する研究

本研究により同定した複数の NTG 感受性遺伝子の本病発症に対する相対的寄与を規定し、複数の遺伝子および遺伝子領域の重複（組み合わせ）により本病発症のリスクを有意に増大させるかを検討する。また、安価かつ迅速に NTG 感受性遺伝子内の SNP 判定が行える診断システムおよびキットの開発を行う。

（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

1) NTG クライテリアの確立と迅速かつ品質を維持した検体収集ネットワークの構築

当初の案を下地に、下記 NTG 診断基準 I ~ III を定めた。

I. 眼圧が常に 21mmHg 以下で、正常外観の隅角所見を有し、少なくとも 1 眼に緑内障性視神経乳頭変化とそれに対応する視野変化をもつ。

II. 視野評価判定は Humphrey 静的視野測定にて、Anderson & Patella の基準に準じ $P < 5\%$ の感度低下を示す検査点が、最周辺以外の 3 つ以上の隣接する検査点に存在し、かつ、うち 1 点が $P < 1\%$ の感度低下を示す。

III. 診断時 50 才まではいかなる stage の視野変化でもよいが、50 才以上 55 才未満であれば mean deviation が -10dB より不良なもの。

IV. 除外基準: ① 緑内障様視神経乳頭変化を惹起し得る局所的・全身的な疾患を有するもの、② エントリー時 20 歳未満ないし診断時 60 才以上、③ 屈折異常が等価球面で -8D を超えるもの。

また、今回高品質なゲノム DNA を確保するシステムを確立した。条件検討の結果、ゲノム DNA の断片化が DNA 抽出前の血液の保存状態、特に温度および日数に対する依存が大きいことが判明

したため、各医療機関で採血した検体は、4℃の保存状態で横浜市大眼科学教室に輸送され、遅くとも 1 週間以内にゲノム DNA の抽出を行う検体収集システムを構築した。この検体収集システムにより、DNA の断片化はほとんど起こらず、質の高い DNA をゲノム解析に使用することが可能になった。

2) MS を用いた疾患感受性遺伝子同定法の確立

本研究では、目標以上の 34,269 個の多型マイクロサテライトマーカーの設定を完了した。その平均解像度は 83.2kb/1 マーカー（平均 83.2kb に 1 マーカーが存在）であった。また、平均ヘテロ接合率は 0.69、平均アリル数は 7.0 個と計算され、遺伝的相関解析を行うに足る、多型性に富んだマイクロサテライトマーカーをゲノム全体にわたって高密度に収集することに成功した。さらに、それら多型マイクロサテライトマーカーのプレートセットの作製および Pooled DNA 法の検証・確立を行い、ゲノムワイドな遺伝的相関解析のハイスループットな高速タイピング系を構築した。

3) ゲノムワイドな MS による相関解析を用いた NTG の感受性遺伝子の検索

患者、健常者ともに 138 検体ずつを混合した pooled DNA を用いて 23,465 個全ての MS を対象に 1 次スクリーニングを行った。その結果、約 13.5% の 3,125 個の MS マーカーが P 値 0.05 未満の陽性を示した。現在、偽陽性の MS マーカーを除外するため、1 次 pooled DNA と異なる集団（2 次 pooled DNA: 患者、健常者ともに 90 検体ずつ混合）を用い、3,125 個の陽性マーカーを対象に 2 次 pooled DNA スクリーニングを行っている。現時点で、1 次および 2 次の両方の患者集団と有意に相関を示す陽性 MS マーカーを 527 個検出している（表 1）。

4) DNA チップによる NTG 感受性遺伝子の全ゲノム網羅的解析

NTG 患者 305 検体、健常者 355 検体について Affymetrix 社 GeneChip® mapping 500k アレイ（500,568 個の SNP）を用いた SNP タイピングを終了した。500,568 個の SNP のうち、325,947 個の SNP がクオリティーチェックを満たした。これら 325,947 個の SNP について統計解析を行った結果、18,039 個の SNP が P 値 0.05 未満の陽性を示した。疾患とより顕著な相関を示す P 値 0.0001 未満では 27 個の SNP が陽性を示した（表 2）。

27 個の SNP ($P < 0.0001$) のうち、2 番染色体と 6 番染色体に位置する遺伝子領域にて複数の陽性 SNP が観察された（図 1、2）。これら 2 遺伝子（仮称: A、B）の発現は感受性 SNP の保有に比例し、有意な増大を示した（図 3A、B）。

5) NTG 発症に関わる候補遺伝子の多型解析

総計 15 個の遺伝子および遺伝子座を対象に候補遺伝子解析を行った (表 3)。その結果、3 遺伝子 (SLC1A1, SLC1A3, TLR4) および 3 遺伝子座 (GLC1B, GLC1F, GPDS1) の多型が本病と有意な相関を示した。TLR4 遺伝子および GLC1B と GLC1F の 2 遺伝子座の多型が疾患感受性を示したのに対し、SLC1A1 と SLC1A3 の 2 遺伝子と GPDS1 遺伝子座の多型は疾患発症に対して抵抗性を示した。

6) NTG 迅速遺伝子診断キットの開発に関する研究

同定した複数の NTG 感受性遺伝子内の疾患特異的な感受性 SNP による疾患発症に対する相加・相乗作用を算出し、これら NTG 感受性 SNP の重複 (組み合わせ) による NTG 発症の相対危険率の有意な増大を見出した。

また、等温増幅法の一つである Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法を改良した low resolution タイピング法を開発した。この方法では SYBR Green I 存在下で増幅を行い、蛍光強度の増大を検出することにより、30~60 分の増幅でタイピング可能であった。また、等温で増幅を行った後に SYBR Green I を加えることにより、目視でもタイピング可能であった。このタイピング法をプラスチック基板上で行った場合も、その特異性を確認できた。

D. 考察

1) NTG クライテリアの確立と迅速かつ品質を維持した検体収集ネットワークの構築

NTG は多因子疾患と考えられており、その発症にはさまざまな要因が関与していることが示唆される。本研究では、遺伝的要因が強く関与している NTG のみを抽出してその疾患感受性遺伝子を同定することを目的としており、通常の NTG の診断基準よりも数段厳しいクライテリアを課して、NTG をより純粋な単一疾患に絞り込んだ。すなわち、老化による影響を除いた早期発症、早期重症型の遺伝的要因の強い NTG のみを本研究の対象にした。平成 20 年度までに、このクライテリアを満たす NTG 検体を全国から 305 検体収集できた。これら 305 検体を用いて遺伝子解析を行った結果、遺伝的寄与の顕著な NTG 感受性遺伝子を複数同定した (結果 4)、5) を参照)。

また、今回、全国規模で行われている検体収集の保存、輸送の条件が設定され、質の高い検体収集ネットワークが構築された。このことで高品質な DNA を解析に使用することが可能になったことに加え、各施設で抽出するために生じる労力と

予算を削減することが可能となった。

2) MS を用いた疾患感受性遺伝子同定法の確立

本研究では多因子疾患のゲノムワイドな遺伝的相関解析を想定し、約 3 万個を目標に多型マイクロサテライトマーカーの収集・設定を行った。その結果、全染色体にわたって 83kb に 1 個の密度で、34,269 個の多型マイクロサテライトマーカーの設定を完了し、収集した多型マイクロサテライトマーカーのプレートセット化を行った。いずれのマーカーも多型性に富んだマーカーであり、疾患の遺伝的解析のみならず、ヒトの進化研究を進める際に、有益な参考情報を与えるものと期待される。また、本研究で確立された Pooled DNA 法を利用することで、より簡便かつハイスループットな全ゲノム相関解析が可能となった。本研究により確立されたこの高速タイピング系を用いて、効率的に疾患感受性候補領域を 100 kb 以内に絞り込んだのち、その絞り込まれた領域内について SNP 解析を行うことで、迅速に疾患感受性遺伝子および疾患特異的な変異の同定を行うことができるものと期待される。

3) ゲノムワイドな MS による相関解析を用いた NTG の感受性遺伝子の検索

23,465 個の MS マーカーについて 1 次 pooled DNA スクリーニングが終了し、 P 値 0.05 未満で判定して約 13.5% の 3,125 個の陽性 MS マーカーが得られている。この中には偽陽性のマーカーが多く含まれていると考えられ、偽陽性のマーカーを除外するため、現在 2 次 pooled DNA スクリーニングを行っているところである。今後、1 次および 2 次の両方の患者集団と有意な相関を示す MS マーカーに対して 3 次スクリーニングを行い、陽性マーカーを絞り込んでいく必要がある。

4) DNA チップによる NTG 感受性遺伝子の全ゲノム網羅的解析

私達は老化等の外的要因による影響を除いた遺伝的要因の強い NTG を対象とするため、通常の NTG の診断基準よりも数段厳しい診断基準を課して NTG をより純粋な単一疾患に絞り込んだ後、全染色体の網羅的解析を行ってきた。その結果、遺伝的寄与の顕著な NTG 感受性遺伝子を複数同定した。特に 2 番および 6 番染色体に位置する NTG 感受性遺伝子の NTG 発症に対する寄与度は極めて高いことが推測される。今後、同定された遺伝子内の感受性 SNP を対象に日本人および他人種の追加検体を用いて多型解析を行い、再現性を検討する必要がある。また、NTG 感受性遺伝子の機能解析を行うことで NTG の病態および発症機序の解明が期待される。

5) NTG 発症に関わる候補遺伝子の多型解析

本研究では、NTG の病態、機能異常に基づいて本病発症に関与が示唆される遺伝子および遺伝子座について候補遺伝子解析を行い、複数の遺伝子および遺伝子座と NTG の有意な相関が認められた。今後、他人種の NTG 検体を対象に解析を行い、それら有意な相関の再現性を検討する必要がある。

6) NTG 迅速遺伝子診断キットの開発に関する研究

NTG 感受性 SNP の組み合わせによる NTG 発症の相対危険率の有意な増大 (相加・相乗作用) を見出した。しかしながら、感受性 SNP の組み合わせから相対危険率をより正確に予測・定量するアルゴリズムは構築されていない。今後、相乗モデル (multiplicative model) と相加モデル (additive model) を基に感受性 SNP の組み合わせから相対危険率予測アルゴリズムを作成する必要がある。

また本研究により、安価かつ迅速な SNP 診断システムの開発を目的とする LAMP 法を改良した low resolution タイピング法の有効性が確認された。今後、これらに tag を付けたプローブを用いて行うことより multiplex 化および、SNP 検出への適用を行う。

E. 結論

NTG は本人の自覚症状も少なく、本人が気付かないうちに視神経障害 (視野障害) が進行していることが多いため、NTG の迅速な診断の確立が必要とされる。NTG 感受性 SNP の組み合わせにより NTG 発症のリスクが有意に増大したことから、本研究事業にて同定された感受性遺伝子の情報は NTG の迅速診断に有効であるといえる。NTG の迅速遺伝子診断キットが開発されれば、健康診断などで迅速に NTG の遺伝子診断が可能になる。これにより、①将来自分が NTG になる確率 (相対危険率) を事前に知ることが可能となる。相対危険率が何倍の NTG 危険因子を何個所持するということを事前に知ることができれば、本人および医療関係者に与える医学的価値は極めて高い。②NTG の早期診断により、早期の治療が可能になるため、NTG の重症化や失明に至る症例を減少させることが可能となる。すなわち、重症の視覚障害者を減少させることになり、患者本人の QOL の向上のみならず、患者が労務継続可能となることによる社会経済効果、また保健医療、社会保障のコスト削減など社会的にも経済的にも貢献

度は大変高いと考えられる。

今後、日本人および他人種の NTG 検体の収集を継続して行い、本研究事業にて同定された感受性遺伝子の再現性を検証し、遺伝要因が多数重なることにより発症すると考えられる NTG の疾患感受性遺伝子を明確にしていきたい。さらに、高齢化社会の到来とともに懸念される NTG 患者数の増加を踏まえ、本研究により得られる遺伝情報をもとに NTG の迅速遺伝子診断キットを作成し NTG の早期発見、早期治療に活用していきたい。また、最終的にはそれらの遺伝情報をもとに、NTG の分子遺伝学的発症機序を解明し、ゲノム創薬へと繋げることで、NTG の根治治療への道を開いていきたい。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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* 67(5): 390-394, 2006.
- 2) Chen X, Katoh Y, Nakamura K, Oyama N, Kaneko F, Endo Y, Fujita T, Nishida T, **Mizuki N**: Single nucleotide polymorphisms of Ficolin 2 gene in Behcet's disease. *J Dermatol Sci* 43(3): 201-205, 2006.
- 3) Yanagihori H, Oyama N, Nakamura K, **Mizuki N**, Oguma K, Kaneko F: 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.
- 4) Hasumi Y, Inoko H, Ota M, Kulski JK, Nishizaki R, Mok J, Oka A, Okada E, Kumagai N, Nishida T, Ohno S, **Mizuki N**: Analysis of single nucleotide polymorphisms at 13 loci within the transforming growth factor-induced factor gene shows no association with high myopia in Japanese subjects. *Immunogenetics* 58(12): 947-953, 2006.
- 5) Horie Y, Takemoto Y, Miyazaki A, Namba K, Kase S, Yoshida K, **Mizuki N**, Ohno S: Tyrosinase gene family and Vogt-Koyanagi-Harada disease in Japanese patients. *Mol Vis* 20(12): 1601-1605, 2006.
- 6) Matsuda 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: Genetic polymorphisms in the promoter of the interferon gamma receptor 1 gene are associated with atopic cataracts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48(2): 583-589, 2007.
- 7) 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.
 - 8) Yatsu K, **Mizuki N**, Hirawa N, Oka A, Itoh 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.
 - 9) 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(2): 151-157, 2007.
 - 10) 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.
 - 11) Mizuki N, Meguro A, Tohnai I, Gul A, Ohno S, **Mizuki N**: Association of major histocompatibility complex class I chain-related gene A and HLA-B alleles with Behcet's disease in Turkey. *Jpn J Ophthalmol* 51: 431-436, 2007.
 - 12) 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.
 - 13) Sasaki S, Ota M, Meguro A, Nishizuka R, Okada E, Mok J, Kimura T, Oka A, Katsuyama Y, Ohno S, Inoko H, **Mizuki N**: A single nucleotide polymorphism analysis of the LAMA1 gene in Japanese patients with high myopia. *Clinical Ophthalmology* 1(3): 289-295, 2007.
 - 14) Yamane T, Mok J, Okada E, Oka A, Nishizaki R, Meguro A, Yonemoto J, Kulski JK, Ohno S, **Inoko H**, **Mizuki N**: Lack of association with high myopia and the MYP2 locus in the Japanese population by high resolution microsatellite analysis on chromosome 18. *Clinical Ophthalmology* 1(3): 311-316, 2007.
 - 15) 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-gamma gene and Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Mol Vis* 13: 2334-2338, 2007.
 - 16) Shibuya E, Meguro A, Ota M, Kashiwagi K, Mabuchi F, Iijima H, Kawase K, Yamamoto T, Nakamura M, Negi A, Sagara T, Nishida T, Inatani M, Tanihara H, Aihara M, Araie M, Fukuchi T, Abe H, Higashide T, Sugiyama K, Kanamoto T, Kiuchi Y, Iwase A, Ohno S, Inoko H, **Mizuki N**: Association of toll-like receptor 4 gene polymorphisms with normal tension glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49(10):4453-4457, 2008.
 - 17) Akiyama M, Yatsu K, Ota M, Katsuyama Y, Kashiwagi K, Mabuchi F, Iijima H, Kawase K, Yamamoto T, Nakamura M, Negi A, Sagara T, Kumagai N, Nishida T, Inatani M, Tanihara H, Ohno S, Inoko H, **Mizuki N**: Microsatellite analysis of the GLC1B locus on chromosome 2 points to NCK2 as a new candidate gene for normal tension glaucoma. *Br J Ophthalmol* 92: 1293-1296, 2008.
 - 18) Nomura N, Nomura M, **Mizuki N**, Hamada J: Rac1 mediates phorbol 12-myristate 13-acetate-induced migration of glioblastoma cells via paxillin. *Oncol Rep* 20(4): 705-711, 2008.
 - 19) Meguro A, Ota M, Katsuyama Y, Oka A, Ohno S, Inoko H, **Mizuki N**: Association of the toll-like receptor 4 gene polymorphisms with Behcet's disease. *Ann Rheum Dis*, 67(5):725-727, 2008.
 - 20) Kirino Y, Takeno M, Watanabe R, Murakami S, Kobayashi M, Ideguchi H, Ihata A, Ohno S, Ueda A, **Mizuki N**, Ishigatubo Y: Association of reduced HO-1 with excessive TLR4 expression in peripheral blood mononuclear cells of Behcet's disease. *Arthritis Res Ther* 10(1): R16, 2008.
 - 21) Hayashi T, Yamagami S, Tanaka K, Yokoo S, Usui T, Amano S, **Mizuki N**: A mouse model of allogeneic corneal endothelial cell transplantation. *Cornea* 27(6): 699-705, 2008.
 - 22) Akahoshi M, Ishihara M, Namba K, Kitaichi N, Ando Y, Takenaka S, Ishida T, Ohno S, **Mizuki N**, Nakashima H, Shirakawa T: Mutation screening of the CARD15 gene in sarcoidosis. *Tissue Antigens*. 71(6): 564-567, 2008.
 - 23) Uemoto R, **Mizuki N**: Spontaneous closure of a macular hole caused by a ruptured retinal arterial macroaneurysm. *Eur J Ophthalmol*, 18(3): 462-465, 2008.
 - 24) Takemoto Y, Naruse T, Numba K, Kitaichi N, Ota M, Shindo Y, **Mizuki N**, Gul A, Madanat W, Shams H, Davatchi F, Inoko H, Ohno S, Kimura A: Re evaluation of heterogeneity in HLA-B*510101 associated with Behcet's disease. *Tissue Antigens* 72(4):347-353, 2008.
 - 25) Yasuoka H, Yamaguchi Y, **Mizuki N**, Nishida T, Kawakami Y, Kuwana M: Preferential activation of circulating CD8⁺ and gammadelta T cells in patients with active Behcet's disease and

- HLA-B51. Clin Exp Rheumatol 26(4 Suppl 50):S59-63, 2008.
- 26) Nishizaki R, Ota M, Inoko H, Meguro A, Shiota T, Okada E, Mok J, Oka A, Ohno S, **Mizuki N**: New susceptibility locus for high myopia is linked to the uromodulin-like 1 (UMODL1) gene region on chromosome 21q22.3. Eye 23(1):222-229, 2009.
- 27) Tomiyama R, Meguro A, Ota M, Katsuyama Y, Nishide T, Uemoto R, Iijima Y, Ohno S, Inoko H, **Mizuki N**: Investigation of association between TLR2 gene polymorphisms and Behçet's disease in Japanese patients. Human Immunol 70(1): 41-44, 2009.
- 28) Kamio M, Meguro A, Ota M, Nomura N, Kashiwagi K, Mabuchi F, Iijima H, Kawase K, Yamamoto T, Nakamura M, Negi A, Sagara T, Nishida T, Inatani M, Tanihara H, Aihara M, Araie M, Fukuchi T, Abe H, Higashide T, Sugiyama K, Kanamoto T, Kiuchi Y, Iwase A, Ohno S, Inoko H, **Mizuki N**: Investigation of the association between the GLC3A locus and normal tension glaucoma in Japanese patients by microsatellite analysis. Clinical Ophthalmol 3: 183-188, 2009.
- 29) Nakamura K, Ota M, Meguro A, Nomura N, Kashiwagi K, Mabuchi F, Iijima H, Kawase K, Yamamoto T, Nakamura M, Negi A, Sagara T, Nishida T, Inatani M, Tanihara H, Aihara M, Araie M, Fukuchi T, Abe H, Higashide T, Sugiyama K, Kanamoto T, Kiuchi Y, Iwase A, Ohno S, Inoko H, **Mizuki N**: Association of microsatellite polymorphisms of the GPDS1 locus with normal tension glaucoma in the Japanese population. Clinical Ophthalmol 3: 307-312, 2009.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許申請
- 名称: 正常眼圧緑内障疾患感受性遺伝子及びその利用, 出願番号: 特願 2008-302986, 出願日: 2008/11/27, 出願人: 横浜市立大学, 発明者: 木本信久

表1. マイクロサテライトマーカー解析の進捗

染色体 番号	1次スクリーニング			2次スクリーニング		
	実験数	解析数	陽性数 (%)	実験数	解析数	陽性数 (%)
1	1,895	1,872	243 (13.0)	243	201	46 (22.9)
2	2,053	2,014	249 (12.4)	249	214	49 (22.9)
3	1,650	1,601	152 (9.5)	152	125	21 (16.8)
4	1,554	1,531	215 (14.0)	215	181	37 (20.4)
5	1,500	1,486	195 (13.1)	195	157	29 (18.5)
6	1,369	1,351	204 (15.1)	204	175	39 (22.3)
7	1,370	1,356	206 (15.2)	206	183	38 (20.8)
8	1,103	1,090	159 (14.6)	159	130	28 (21.5)
9	956	947	138 (14.6)	138	101	22 (21.8)
10	1,097	1,083	136 (12.6)	136	108	21 (19.4)
11	1,076	1,048	135 (12.9)	135	97	18 (18.6)
12	1,128	1,117	148 (13.2)	148	122	24 (19.7)
13	806	794	123 (15.5)	123	93	20 (21.5)
14	709	699	124 (17.7)	124	108	23 (21.3)
15	610	599	91 (15.2)	91	75	17 (22.7)
16	631	623	106 (17.0)	106	80	17 (21.3)
17	626	615	93 (15.1)	93	70	15 (21.4)
18	649	630	94 (14.9)	94	79	18 (22.8)
19	454	450	55 (12.2)	55	47	9 (19.1)
20	501	500	66 (13.2)	66	51	8 (15.7)
21	296	293	52 (17.7)	52	41	10 (24.4)
22	251	248	40 (16.1)	40	28	6 (21.4)
X	1,105	1,093	100 (9.1)	100	72	12 (16.7)
Y	76	74	1 (1.3)	1	1	0 (0.0)
計	23,465	23,114	3,125 (13.5)	3,125	2,539	527 (20.8)

表 2. DNA チップを用いた全ゲノム網羅的解析により検出された $P < 0.0001$ を示す 27 個の陽性 SNP

SNP ID	Chr.	MAF	<i>P</i> value	OR (95%CI)
SNP2-1	2	0.13	6.24×10^{-6}	0.46 (0.32-0.67)
SNP2-2	2	0.13	2.50×10^{-9}	0.36 (0.25-0.51)
SNP2-3	2	0.11	6.22×10^{-6}	0.42 (0.28-0.64)
SNP2-4	2	0.12	4.14×10^{-6}	0.43 (0.29-0.64)
SNP2-5	2	0.11	2.54×10^{-6}	0.41 (0.27-0.61)
SNP2-6	2	0.14	2.97×10^{-5}	0.50 (0.35-0.71)
SNP2-7	2	0.12	9.70×10^{-5}	0.50 (0.34-0.74)
SNP2-8	2	0.23	5.32×10^{-5}	0.59 (0.78-0.44)
SNP3-1	3	0.05	7.08×10^{-5}	3.37 (1.78-6.37)
SNP3-2	3	0.05	4.43×10^{-5}	3.46 (1.83-6.52)
SNP4-1	4	0.37	3.97×10^{-5}	1.70 (1.32-2.18)
SNP6-1	6	0.32	9.64×10^{-5}	1.68 (1.30-2.19)
SNP6-2	6	0.34	3.60×10^{-5}	1.75 (1.35-2.29)
SNP6-3	6	0.11	1.63×10^{-5}	0.41 (0.27-0.62)
SNP6-4	6	0.46	4.14×10^{-6}	0.59 (0.46-0.75)
SNP6-5	6	0.34	6.85×10^{-5}	1.60 (1.24-2.07)
SNP6-6	6	0.32	7.78×10^{-5}	1.62 (1.24-2.10)
SNP6-7	6	0.31	7.75×10^{-5}	1.62 (1.24-2.11)
SNP6-8	6	0.35	5.33×10^{-5}	1.64 (1.25-2.13)
SNP6-9	6	0.35	6.72×10^{-5}	1.62 (1.25-2.10)
SNP6-10	6	0.35	5.33×10^{-5}	1.63 (1.26-2.11)
SNP6-11	6	0.31	7.79×10^{-5}	1.64 (1.25-2.13)
SNP6-12	6	0.09	4.69×10^{-5}	2.73 (1.67-4.47)
SNP7-1	7	0.41	6.26×10^{-5}	1.66 (1.30-2.13)
SNP7-2	7	0.36	1.02×10^{-5}	1.81 (1.39-2.35)
SNP11-1	11	0.12	4.41×10^{-5}	2.24 (1.51-3.32)
SNP11-2	11	0.27	2.80×10^{-5}	1.80 (1.37-2.38)

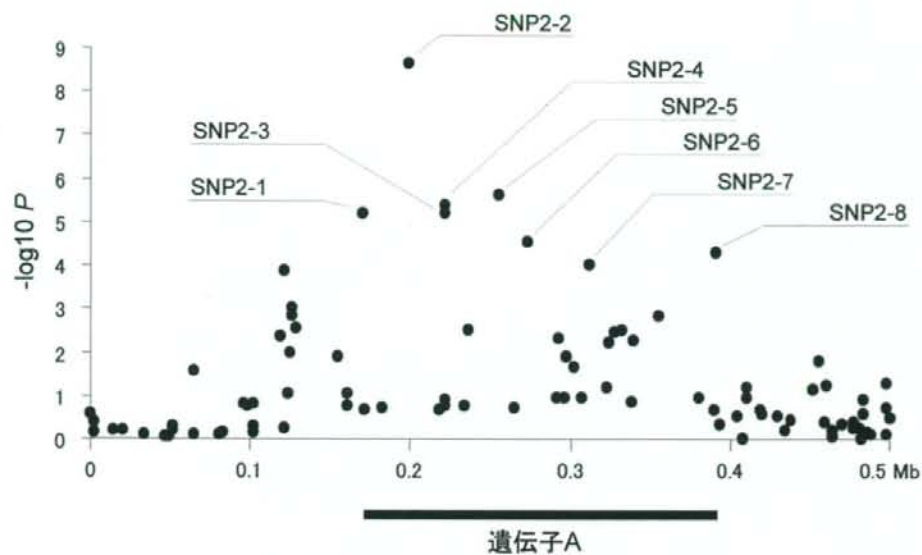


図1. 2番染色体のA遺伝子領域上のSNP分布

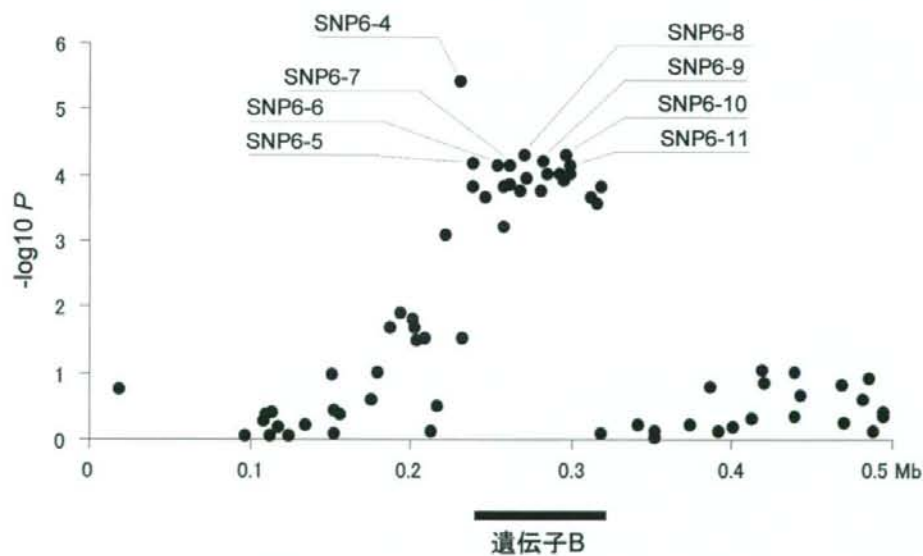


図2. 6番染色体のB遺伝子領域上のSNP分布

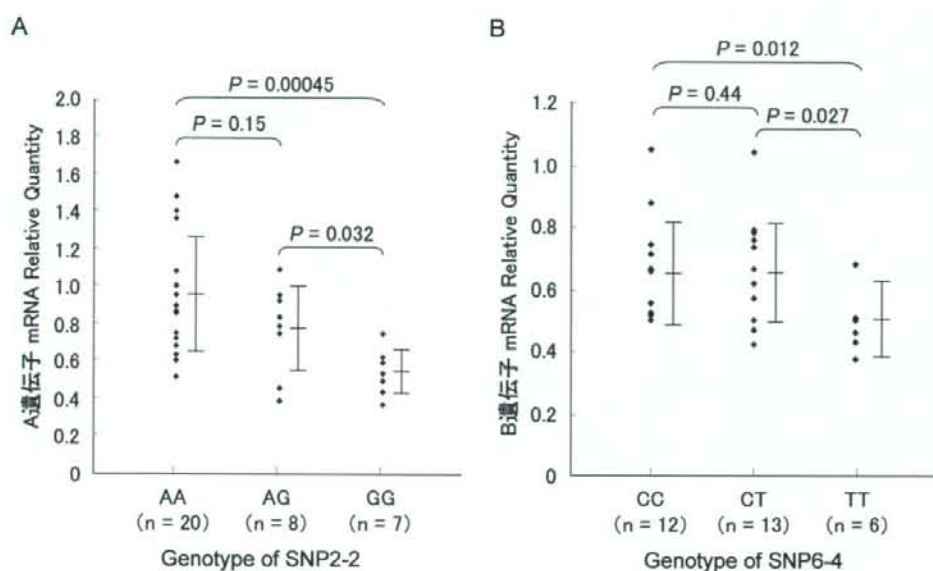


図3. 感受性SNPの遺伝子型によるA遺伝子およびB遺伝子のmRNAの発現量の比較

表3. 候補遺伝子解析の結果

遺伝子/ 遺伝子座	位置	検体数		関連
		患者	健常者	
MYOC	1q24.3-q25.2	142	102	×
CYP1B1	2p22-p21	142	102	×
GLC1B	2cen-q13	143	103	○ 感受性
TLR9	3p21.3	142	125	×
UCHL1	4p14	142	102	×
TLR2	4q32	200	128	×
SLC1A3	5p13	142	102	○ 抵抗性
GRIA1	5q33	142	102	×
HLA-DRB1	6p21.3	114	189	×
GLC1F	7q35-q36	142	102	○ 感受性
GPDS1	7q35-q36	142	102	○ 抵抗性
SLC1A1	9p24	142	126	○ 抵抗性
TLR4	9q32-q33	250	359	○ 感受性
CUL5	11q22-q23	142	126	×
TLR7	Xp22.3	141	102	×

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
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
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
Hasumi Y, Inoko H, Ota M, et al.	Analysis of single nucleotide polymorphisms at 13 loci within the transforming growth factor-induced factor gene shows no association with high myopia in Japanese subjects	Immunogenetics	58(12)	947-953	2006
Horie Y, Takemoto Y, Miyazaki A, et al.	Tyrosinase gene family and Vogt-Koyanagi-Harada disease in Japanese patients	Mol Vis	20(12)	1601-1605	2006
Matsuda A, Ebihara N, Kumagai N, et al.	Genetic polymorphisms in the promoter of the interferon gamma receptor 1 gene are associated with atopic cataracts	Invest Ophthalmol Vis Sci	48(2)	583-589	2007
Hayashi T, Inoko H, Nishizaki R, et al.	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
Yatsu K, Mizuki N, Hirawa N, et al.	High-resolution mapping for essential hypertension using microsatellite markers	Hypertension	49(3)	446-452	2007
Inamori Y, Ota M, Inoko H, et al.	The COL1A1 gene and high myopia susceptibility in Japanese	Hum Genet	122(2)	151-157	2007
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
Mizuki N, Meguro A, Tohnai I, et al.	Association of major histocompatibility complex class I chain-related gene A and HLA-B alleles with Behcet's disease in Turkey	Jpn J Ophthalmol	51	431-436	2007
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
Sasaki S, Ota M, Meguro A, et al.	A single nucleotide polymorphism analysis of the LAMA1 gene in Japanese patients with high myopia	Clinical Ophthalmol	1(3)	289-295	2007
Yamane T, Mok J, Okada E, et al.	Lack of association with high myopia and the MYP2 locus in the Japanese population by high resolution microsatellite analysis on chromosome 18	Clinical Ophthalmol	1(3)	311-316	2007
Horie Y, Kitaichi N, Takemoto Y, et al.	Polymorphism of IFN-gamma gene and Vogt-Koyanagi-Harada disease	Mol Vis	13	2334-2338	2007

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shibuya E, Meguro A, Ota M, et al.	Association of toll-like receptor 4 gene polymorphisms with normal tension glaucoma	Invest Ophthalmol Vis Sci	49(10)	4453-4457	2008
Akiyama M, Yatsu K, Ota M, et al.	Microsatellite analysis of the GLC1B locus on chromosome 2 points to NCK2 as a new candidate gene for normal tension glaucoma	Br J Ophthalmol	92	1293-1296	2008
Nomura N, Nomura M, Mizuki N, et al.	Rac1 mediates phorbol 12-myristate 13-acetate-induced migration of glioblastoma cells via paxillin	Oncol Rep	20(4)	705-711	2008
Meguro A, Ota M, Katsuyama Y, et al.	Association of the toll-like receptor 4 gene polymorphisms with Behcets disease	Ann Rheum Dis	67(5)	725-727	2008
Kirino Y, Takeno M, Watanabe R, et al.	Association of reduced HO-1 with excessive TLR4 expression in peripheral blood mononuclear cells of Behcet's disease	Arthritis Res Ther	10(1)	R16	2008
Hayashi T, Yamagami S, Tanaka K, et al.	A mouse model of allogeneic corneal endothelial cell transplantation	Cornea	27(6)	699-705	2008
A kahoshi M, Ishihara M, Namba K, et al.	Mutation screening of the CARD15 gene in sarcoidosis	Tissue Antigens	71(6)	564-567	2008
Asukata Y, Ishihara M, Hasumi Y, et al.	Guideline for the diagnosis of ocular sarcoidosis	Ocular Immunol Inflamm	16(3)	77-81	2008
Uemoto R, Mizuki N	Spontaneous closure of a macular hole caused by a ruptured retinal arteriole macroaneurysm	Eur J Ophthalmol	18(3)	462-465	2008
Tsuchiya AK, Tanaka K, Sakurada I, et al.	Ultrasound biomicroscopic measurement of anterior chamber biometry between before and after pupil dilation in children	Eur J Ophthalmol	18(4)	532-539	2008
Takemoto Y, Naruse T, Numba K, et al.	Re evaluation of heterogeneity in HLA-B*510101 associated with Behcet's disease	Tissue Antigens	72(4)	347-353	2008
Yasuoka H, Yamaguchi Y, Mizuki N, et al.	Preferential activation of circulating CD8 ⁺ and gammadelta T cells in patients with active Behcet's disease and HLA-B51	Clin Exp Rheumatol	26(4 Suppl 50)	S59-63	2008
Nishizaki R, Ota M, Inoko H, et al.	New susceptibility locus for high myopia is linked to the uromodulin-like 1 (UMODL1) gene region on chromosome 21q22.3	Eye	23(1)	222-229	2009
Tomiyama R, Meguro A, Ota M, et al.	Investigation of association between TLR2 gene polymorphisms and Behcet's disease in Japanese patients	Human Immunol	70(1)	41-44	2009
Kamio M, Meguro A, Ota M, et al.	Investigation of the association between the GLC3A locus and normal tension glaucoma in Japanese patients by microsatellite analysis	Clinical Ophthalmol	3	183-188	2009
Nakamura K, Ota M, Meguro A, et al.	Association of microsatellite polymorphisms of the GPDS1 locus with normal tension glaucoma in the Japanese population	Clinical Ophthalmol	3	307-312	2009

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

Y. Itoh¹, H. Inoko², J. K. Kulski², S. Sasaki¹, A. Meguro¹, N. Takiyama¹, T. Nishida³, T. Yuasa⁴, S. Ohno⁵ & N. Mizuki¹

1 Department of Ophthalmology and Visual Science, Yokohama City University Graduate School of Medicine, 3-9 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama, Kanagawa 236-0004, Japan

2 Department of Molecular Life Science, Division of Molecular Medical Science and Molecular Medicine, Tokai University School of Medicine, Bohseidai, Isehara, Kanagawa 259-1193, Japan

3 Department of Ophthalmology, Seirei Yokohama Hospital, 215 Iwai-cho, Hodogaya-ku, Yokohama, Kanagawa 240-8521, Japan

4 Yuasa Eye Clinic, 3-1-1 Nishimoto-cho, Nishi-ku, Osaka, Osaka 550-0005, Japan

5 Department of Ophthalmology and Visual Sciences, Hokkaido University Graduate School of Medicine, North 15 west 7, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido 060-8638, Japan

Key words

B*5101; Behcet's disease; four-digit genotyping; HLA; Luminex

Correspondence

Prof Nobuhisa Mizuki
Department of Ophthalmology
and Visual Science
Yokohama City University Graduate
School of Medicine
3-9 Fukuura
Kanazawa-ku
Yokohama
Kanagawa 236-0004
Japan
Tel: +81 45 787 2683
Fax: +81 45 781 9755
e-mail: mizunobu@med.yokohama-cu.ac.jp

Received 18 November 2005; Revised 9 February 2006; Accepted 22 February 2006

doi: 10.1111/j.1399-0039.2006.00586.x

Introduction

Behcet's disease (BD) is a recurrent systemic inflammatory disorder characterized by four major symptoms consisting of oral aphthous ulcers, ocular lesions, skin lesions and genital ulcerations and occasionally by inflammation in tissues and organs throughout the body including the vascular system, central nervous system, gastrointestinal tract and others (1–18). This disease is distributed worldwide with the highest prevalence in Asian and Eurasian populations along the Silk Route and stretching to the countries of the Mediterranean region (3, 4). Although

Abstract

The present study represents the first four-digit allele genotyping of HLA-A and -B in Japanese Behcet's disease (BD) patients and controls using a new genotyping method (named the PCR-SSOP-Luminex method) to determine the association of certain HLA-A or -B alleles with BD. Peripheral blood lymphocytes were collected from 180 Japanese BD patients and 170 healthy controls. The genotype frequency of HLA-B*5101 was significantly increased in the patients (61.7%) as compared with the controls (15.9%) ($P_c = 1 \times 10^{-16}$, OR = 8.5). When we recalculated the phenotype frequencies after excluding the HLA-B*51-positive patients and controls to account for the effects of the linkage disequilibrium and the abundance of the HLA-B*51 allele, the frequencies of HLA-A*2602 and HLA-B*3901 had a weak association in the patient group without HLA-B*51 as compared with the control group without HLA-B*51 (A*2602; $P_c = 0.130$, OR = 4.3, B*3901; $P_c = 0.099$, OR = 3.5). This study confirmed on the basis of using a new and more accurate genotyping method that Japanese BD patients have a strong primary association with HLA-B*5101. The significant increase of HLA-A*2602 and B*3901 in the patient group without HLA-B*51 suggests that these two alleles might also have some secondary influence on the onset of BD.

the cause and pathogenesis of BD are still uncertain, the onset of BD appears to be triggered by the involvement of some external environment factors on people with a particular genetic background. It has been assumed that one or more infectious agents, immune mechanisms and genetic factors are involved in the onset of BD.

Our group, as well as others, presented evidence for an association between BD and HLA-B*51, one of the split antigens of HLA-B5, and this HLA-B allele has emerged as the genetic marker most strongly associated with the disease (5–18). There are currently 37 different alleles at the four-digit level of genotypes in the B51 antigen group;

B*5101-B*5137 (19) and B*5101 primarily associate in many different ethnic groups including Turkish, Greek, Saudi Arabian, Iranian and Italian patients with BD (11–15). However, the frequency of HLA-B*5108 was also relatively increased in the Iranian, Greek and Italian patient groups (12, 14, 15). In the Japanese population, an increased incidence of B*5101 in the BD patient group (58% as compared with 14% in the control group) was reported (17).

In most previous studies of Japanese patients with BD, the HLA-A and -B alleles were analysed grossly by serological or genotyping methods without being subtyped to the four-digit level of allele resolution (18). The new HLA allele-typing method named polymerase chain reaction (PCR)-sequence-specific oligonucleotide probes (SSOP)-Luminex that we recently developed has enabled us to rapidly detect and type the HLA-A and -B alleles to four digits in small sample volumes (20–22). We succeeded in using the PCR-SSOP-Luminex method for HLA-A and -B genotyping to four-digit allele detection by combining the appropriate probes with an accurate probability of greater than 99.9% and without ambiguities (20).

Here we report for the first time the use of the PCR-SSOP-Luminex method to genotype HLA-A and -B to four-digit alleles in a comparative study of Japanese BD patients and controls to accurately determine the HLA-A and -B alleles that were significantly associated with BD.

Materials and methods

Subjects

One-hundred and eighty Japanese patients with BD were clinically diagnosed at the uveitis clinic of Yokohama City University or Hokkaido University according to the standard criteria proposed by the International Society for BD. As normal controls, 170 healthy Japanese volunteers, unrelated to each other or to the patients and matched to the patients with regard to ethnic origin were also enrolled in this study. Peripheral blood lymphocytes were collected from these patients and the healthy Japanese volunteers after all the patients and controls agreed to a blood examination according to the guideline of the Declaration of Helsinki.

HLA-A and -B typing by the PCR-SSOP-Luminex method

Generic amplifications of the HLA-A and -B genes were performed using biotin-labelled primers at the 5' end, with a GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA). The PCR-SSOP-Luminex method and the PCR-cycling protocol was the same as previously described (20). Each oligonucleotide probe was designed to specifically detect the nucleotide sequences of PCR

products at the polymorphic sites of the HLA-A and -B loci that were covalently coupled to a different set of 5.6- μ m polystyrene carboxylated microbeads (Multi-Analyte Microsphere Carboxylated; Luminex, Austin, TX) using a carbodiimide method with slight modification (20–22). After this step, the hybridized amplicons were labelled with the fluorescent reporter molecule, Streptavidin R-Phycoerythrin (SA-PE; Medical & Biological Laboratories Co., Ltd, Nagoya, Japan). Reactions were then analysed on the flow cytometer, Luminex 100 (Luminex), to identify the fluorescent intensity of Phycoerythrin (PE) on each bead. Genosearch HLA-typing software (G&G SCIENCE Co., Ltd, Fukushima, Japan) was used to assist in determining the genotyping HLA of sample DNA.

Statistical analysis

Phenotype frequencies were estimated by direct counting. The significance of the distribution of alleles between the patients with BD and normal controls was at first analysed by Fisher's exact probability test. The significant primary *P* values were then corrected (corrected *P* value: *P_c* value) using the Bonferroni correction by multiplying the primary *P* value by the number of HLA alleles being tested. A *P* and *P_c* value of less than 0.05 were evaluated as statistically significant. The strength of association was estimated by calculating the OR.

Results

Table 1 summarizes the phenotype frequencies of the HLA-A and -B alleles that were significantly different ($P < 0.05$) between the Japanese patients and controls using the PCR-SSOP-Luminex-genotyping method. Of the 15 HLA-A alleles defined by the PCR-SSOP-Luminex method in the Japanese patients with BD, the phenotype frequencies for four HLA-A alleles were significantly different ($P < 0.05$) between patients and controls. The frequencies of A*2603 and A*3101 were significantly higher in the patients with BD as compared with the healthy controls when not corrected for multiple testing (A*2603: $P = 0.038$, $P_c = 0.57$, OR = 2.8; A*3101: $P = 0.024$, $P_c = 0.366$, OR = 1.7). Conversely, A*0201 and A*3303 were significantly decreased in the patient group when not corrected for multiple testing (A*0201: $P = 0.045$, $P_c = 0.675$, OR = 0.6; A*3303: $P = 0.006$, $P_c = 0.084$, OR = 0.4).

Of the 32 HLA-B alleles detected by the PCR-SSOP-Luminex method, only six HLA-B allele frequencies were significantly different ($P < 0.05$) between the patients and the controls. The frequency of the HLA-B*5101 was 61.7% (111/180) in the patients with BD and significantly higher than 15.9% (27/170) in the healthy controls even when corrected for multiple testing ($P = 3 \times 10^{-18}$,

Table 1 Statistical significant differences between Japanese patients with Behcet's disease (BD) and controls for the phenotypic frequencies of HLA-A and -B

HLA	Controls (n = 170)	Controls (%)	Patients (n = 180)	Patients (%)	P value	Pc value	OR	95% CI
A*0201	46	27.1	34	18.9	0.045	0.675	0.63	0.38-1.04
A*2603	5	2.9	14	7.8	0.038	0.57	2.78	1.02-7.59
A*3101	32	18.8	51	28.3	0.024	0.366	1.7	1.03-2.80
A*3303	28	16.5	13	7.2	0.006	0.084	0.39	0.20-0.77
B*4403	24	14.1	11	6.1	0.01	0.316	0.4	0.19-0.82
B*4801	14	8.2	6	3.3	0.04	1.28	0.38	0.15-0.99
B*5101	27	15.9	111	61.7	3×10^{-16}	1×10^{-16}	8.52	5.28-13.76
B*5102	0	0	3	1.7				
B*5401	32	18.8	12	6.7	0.0001	0.015	0.31	0.16-0.61
B*5601	7	4.1	1	0.6	0.028	0.896	0.13	0.02-0.78

The alleles with $P < 0.05$ and HLA-B*51 alleles in Japanese population are shown. *P* value refers to probability value; *Pc* value refers to corrected probability value; OR refers to odds ratio; 95% CI refers to 95% confidence interval.

$Pc = 1 \times 10^{-16}$, OR = 8.5). On the other hand, the frequency of HLA-B*5401 was significantly lower in BD patients than in controls when corrected for multiple testing ($P = 0.0001$, $Pc = 0.015$, OR = 0.3). The frequencies of B*4403, B*4801 and B*5601 were also significantly lower in the patients with BD than respective frequencies in the healthy controls, but only when not corrected for multiple testing (B*4403: $P = 0.01$, $Pc = 0.316$, OR = 0.4; B*4801: $P = 0.04$, $Pc = 1.28$, OR = 0.4; B*5601: $P = 0.028$, $Pc = 0.896$, OR = 0.1). Interestingly, the HLA-B*5102 allele was detected in three BD patients but not in the control group.

The differences between patients and controls for the frequencies of HLA-A and -B alleles that are summarized in Table 1 cannot be simply evaluated alone without also considering the effect of the linkage disequilibrium and the relative abundance of the B*51 alleles. Therefore, we recalculated the phenotype frequencies again after excluding the HLA-B*5101- or -B*5102-positive patients and controls from the analysis (Table 2). As a result, the frequencies of HLA-A*2602 and -B*3901 were found to be significantly increased in the patient group as compared with the control group when not corrected for multiple testing (A*2602: $P = 0.010$, $Pc = 0.130$, OR = 4.3; B*3901: $P = 0.003$, $Pc = 0.099$, OR = 3.5). In addition, the significant differences ($P < 0.05$) obtained between the patients and controls for the frequencies of eight alleles, A*0201, A*2603, A*3101, A*3303, B*4403, B*4801, B*5401 and B*5601, that are summarized in Table 1

were no longer significant after excluding the HLA-B*5101 and -B*5102 alleles from the analysis as summarized in Table 2.

Discussion

The present study is the first detailed and accurate comparative analysis of the HLA-A and -B allele frequencies in Japanese BD patients and controls subtyped to the four-digit level using a new genotyping method called the PCR-SSOP-Luminex method (20). This new HLA-typing method detected 15 HLA-A alleles and 32 HLA-B alleles with no ambiguities (data not shown). Moreover, the allele genotype and phenotype frequencies in the control group were essentially the same as those previously described for 1018 individuals in the Japanese population using the PCR-SSOP-Luminex method (20).

At present, the HLA-B51 antigen has been subtyped into 37 distinct alleles at four-digit level, HLA-B*5101-B*5137 (19). However, it appears that only HLA-B*5101, -B*5102 and -B*5103 exist in the Japanese population (23, 24). In this study, both the HLA-B*5101 and -B*5102 alleles were found in the patient group, but only the HLA-B*5101 allele was also found in the control group. The frequency of HLA-B*5101 (61.7%) in the patient group was significantly higher than in the control group (15.9%), whereas the number of the HLA-B*5102-positive individuals in the patient and control groups were rare ($n = 3$ and $n = 0$, respectively). Our results have

Table 2 Significant phenotype frequencies between Behcet's disease patients and controls for HLA-A and -B alleles without the HLA-B*51 allele

HLA	Controls (n = 143)	Controls (%)	Patients (n = 67)	Patients (%)	P value	Pc value	OR	95% CI
A*2602	5	3.5	9	13.4	0.01	0.130	4.28	1.48-12.34
B*3901	11	7.7	15	22.4	0.003	0.099	3.46	1.54-7.76

The alleles only with $P < 0.05$ are shown. *P* value refers to probability value; *Pc* value refers to corrected probability value; OR refers to odds ratio; 95% CI refers to 95% confidence interval.

therefore confirmed that the B*5108 allele is rare or possibly non-existent in the Japanese population and that the allelic distribution of Japanese patients with BD are different from those in other ethnic groups. These results are also consistent with our hypothesis that BD spread in the Asians and Eurasians in association with the HLA-B*5101 allele before this allele diverged into other minor suballeles associated with disease, such as HLA-B*5102 and HLA-B*5108 (17).

In the present study, we found that the frequencies of HLA-A*2603 and -A*3101 were significantly increased and, conversely, the frequencies of HLA-A*0201, -A*3303, -B*4403, -B*4801, -B*5401 and -B*5601 were significantly decreased in the patient group (Table 1). However, after we recalculated the genotype frequencies of HLA-A and -B after excluding the patients and healthy controls with HLA-B*5101, no significant difference was observed in all of those alleles between the patient and control groups. Consequently, the significant differences obtained for these eight alleles were probably the result of the influence of the linkage disequilibrium and/or the relative abundance of HLA-B*51. The significant increase of HLA-B*3901 and -A*2602 in the patient group after excluding the effect of the linkage disequilibrium and the relative abundance of HLA-B*51 (Table 2) implied that these two alleles might be involved in the pathogenesis of BD. However, these significant differences ($P < 0.05$) were lost after applying the Bonferroni correction for multiple testing.

We also found that three patients with BD and none of the controls had HLA-B*5102. The three BD patients with B*5102 didn't carry either the HLA-A*2602 or the -B*3901. Considering the effect of linkage disequilibrium, however, all three of the BD patients with HLAB*5102 carried the A*3101 allele (A*2402/*3101 and B*5102/*5901; A*2402/*3101 and B*1518/*5102 and A*1101/*3101 and B*5101/*5102, respectively).

Despite the marked different phenotype frequencies of HLA-B*5101 (61.7%) and -B*5201 (15.0%) among Japanese patients with BD, the allelic sequences are distinguished from each other by only two amino acid substitutions at positions 63 and 67. These two amino acids are shared not only by HLA-B*5101 but also by the other HLA-B*51 alleles except HLA-B*5107. We previously hypothesized that asparagine (Asn) at position 63 and phenylalanine (Phe) at position 67 in HLA-B*51 result in genetic susceptibility to BD and is the primary cause for its onset (5). Amino acid positions at 63 and 67 constitute a part of pocket B in the HLA molecule and play an important role in antigen presentation. However, 63-Asn and 67-Phe are also shared by several of the other HLA-B alleles, such as HLA-B*8, -B*14, -B*35, -B*39 and -B*65. Of these, HLA-B*39 was increased in frequency in the patient group including the B*51-negative patients. It has

remained unclear how our 63-Asn and 67-Phe hypothesis can explain an association of HLA-A*2602 with BD. However, the onset of BD may be caused by a foreign antigen with high affinity for B*5101 and some affinity for A*2602 and/or B*3901. Similarly, an antigen with affinity for both B*5102 and A*3101 may contribute to the onset of BD, but both these possibilities remain to be resolved.

The strong association of B*5101 with BD may be primary or secondary to an association with another neighbouring gene in strong LD. Also, the existence of HLA-B51-negative BD patients suggests that other genetic factors or gene sequences may be involved with the onset of BD. The differences between BD patients and controls with the HLA-B*5101 allele may depend in part on the combination of HLA-B*5101 with other as yet unidentified polymorphic sequences either in the close proximity of the HLA-B locus, such as the *MICA* or *MICB* genes (25), or genes located outside the MHC genomic region (26). In this regard, the development and application of the PCR-SSOP-Luminex method for the detection of polymorphisms at gene loci other than at HLA-A, -B or -C are also needed for future disease association studies.

In conclusion, we carried out four-digit allele genotyping of HLA-A and HLA-B in Japanese patients with BD by the PCR-SSOP-Luminex method and confirmed that HLA-B*5101 has the primary association with BD. On the other hand, HLA-A*2602 and -B*3901 showed weak associations in B*51-negative patients, implying these two alleles might also have some secondary influence on the onset of BD.

Acknowledgments

This work was supported by Grants-in-Aid from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan (No.16209052) and a grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan.

References

- Ohno S, Ohguchi M, Hirose S, Matsuda H, Wakisaka A, Aizawa M. Close association of HLA-Bw51 with Behcet's disease. *Arch Ophthalmol* 1982; **100**: 1455-8.
- Sakane T, Takeno M, Suzuki N, Inaba G. Behcet's disease. *N Engl J Med* 1999; **341**: 1284-91.
- Verity DH, Marr JE, Ohno S, Wallace GR, Stanford MR. Behcet's disease, the Silk Road and HLA-B51: historical and geographical perspectives. *Tissue Antigens* 1999; **54**: 213-20.
- Soto-Vega E, Garcia-Munoz R, Richaud-Patin Y et al. Class I and class II MHC polymorphisms in Mexican patients with Behcet's disease. *Immunol Lett* 2004; **15**: 211-5.
- Mizuki N, Inoko N, Mizuki N et al. Human leukocyte antigen serologic, DNA typing of Behcet's disease, its primary association with B51. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; **33**: 3332-40.

6. Al-Rawi ZS, Sharquie KE, Khalifa SJ, Al-Hadithi FM, Munir JJ. Behcet's disease in Iraqi patients. *Ann Rheum Dis* 1986; **45**: 987-90.
7. Arber N, Klein T, Meiner Z, Pras E, Weinberger A. Close association of HLA-B51 and B52 in Israeli patients with Behcet's syndrome. *Ann Rheum Dis* 1991; **50**: 351-3.
8. Chung YM, Tsai ST, Liao F, Liu JH. A genetic study of Behcet's disease in Taiwan Chinese. *Tissue Antigens* 1987; **30**: 68-72.
9. Gonzalez-Escribano MF, Rodriguez MR, Walter K, Sanchez-Roman J, Garcia-Lozano JR, Nunez-Roldan A. Association of HLA-B51 subtypes and Behcet's disease in Spain. *Tissue Antigens* 1998; **52**: 78-80.
10. Mineshita S, Tian D, Wang LM et al. Histocompatibility antigens associated with Behcet's disease in northern Han Chinese. *Intern Med* 1992; **31**: 1073-5.
11. Pirim I, Atasoy M, Ikbali M, Erdem T, Aliagaoglu C. HLA class I and class II genotyping in patients with Behcet's disease: a regional study of eastern part of Turkey. *Tissue Antigens* 2004; **64**: 293-7.
12. Mizuki N, Ota M, Katsuyama Y, Yabuki et al. Sequencing-based typing of HLA-B*51 alleles and the significant association of HLA-B*5101 and -B*5108 with Behcet's disease in Greek patients. *Tissue Antigens* 2002; **59**: 118-21.
13. Yabuki K, Ohno S, Mizuki N et al. HLA class I and II typing of the patients with Behcet's disease in Saudi Arabia. *Tissue Antigens* 1999; **54**: 273-7.
14. Mizuki N, Ota M, Katsuyama Y et al. HLA class I genotyping including HLA-B*51 allele typing in the Iranian patients with Behcet's disease. *Tissue Antigens* 2001; **57**: 457-62.
15. Kera J, Mizuki N, Ota M et al. Significant associations of HLA-B*5101 and B*5108, and lack of association of class II alleles with Behcet's disease in Italian patients. *Tissue Antigens* 1999; **54**: 565-71.
16. Kilmartin DJ, Finch A, Acheson RW. Primary association of HLA-B51 with Behcet's disease in Ireland. *Br J Ophthalmol* 1997; **81**: 649-53.
17. Mizuki N, Ota M, Katsuyama Y et al. HLA-B*51 allele analysis by the PCR-SBT method and a strong association of HLA-B*5101 with Japanese patients with Behcet's disease. *Tissue Antigens* 2001; **58**: 181-4.
18. Mizuki N, Ohno S, Tanaka H et al. Association of HLA-B51 and lack of association of class II alleles with Behcet's disease. *Tissue Antigens* 1992; **40**: 22-30.
19. Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2004. *Tissue Antigens* 2005; **65**: 301-69.
20. Itoh Y, Mizuki N, Shimada T et al. High throughput DNA typing of HLA-A, -B, -C and -DRB1 loci by a PCR-SSOP-Luminex method in the Japanese population. *Immunogenetics* 2005; **57**: 717-29.
21. Fulton RJ, McDade RL, Smith PL, Kienker LJ, Kettman JR Jr. Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrix system. *Clin Chem* 1997; **43**: 1749-56.
22. Dunbar SA, Vander Zee CA, Oliver KG, Karem KL, Jacobson JW. Quantitative, multiplexed detection of bacterial pathogens: DNA and protein applications of the Luminex LabMAP system. *J Microbiol Methods* 2003; **53**: 245-52.
23. Tanaka H, Akaza T, Juji T. Report of the Japanese Central Bone Marrow Data Center. *Clin Transpl* 1996; 139-44.
24. Tokunaga K, Ishikawa Y, Ogawa A et al. Sequence-based association analysis of HLA class I and II alleles in Japanese supports conservation of common haplotypes. *Immunogenetics* 1997; **46**: 199-205.
25. Cohen R, Metzger S, Nahir M, Chajek-Shaul T. Association of the MIC-A gene and HLA-B51 with Behcet's disease in Arabs and non-Ashkenazi Jews in Israel. *Ann Rheum Dis* 2002; **61**: 157-60.
26. Karasneh J, Gul A, Ollier WE, Silman AJ, Worthington J. Whole-genome screening for susceptibility genes in multicase families with Behcet's disease. *Arthritis Rheum* 2005; **52**: 1836-42.