

て取得し、個人情報には匿名化され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検体を用いた。

HLA-B51 陽性者と陰性者間で有意差を示したマイクロサテライト D6S1130i の両側に位置する *TRIM10*, *TRIM15* 遺伝子領域を網羅する SNP について SNP 関連解析を行った。また、関連を認めた SNP について、さらにハプロタイプ関連解析を行った。

C. 研究結果

TRIM10, *TRIM15* を含む領域(約 22 kbp)の SNP を探索するため、無作為に選んだパーチェット病患者 24 人、健常者 2 人について直接塩基配列決定法により、70 SNPs を同定した。

これら 70 SNPs よりクオリティーコントロールによって選んだ 8 SNPs を TaqMan® SNP Genotyping Assays を用いて全検体についてタイピングを行った。各 SNP について患者-対照関連解析を行った結果、2 SNPs (rs2517646, rs2844787)が弱い相関を示した(両 SNP とも $p_{(x,y)}=0.0006$, OR=1.52) (表 1)。rs2517646 は *TRIM10* のイントロン 6 に、rs2844787 は *TRIM15* の 3'UTR 領域に位置し、それぞれ別の遺伝子に位置することから、両 SNP 間の連鎖不平衡を調査したところ、患者、健常者ともに $D'>0.9$, $r^2=0.98$ と、強い連鎖不平衡を示した(図)。両 SNP の存在するハプロタイプについて患者-対照関連解析を行ったところ、相関を示した ($p_{(x,y)}=0.00001$, OR=1.75)(表 2-ハプロタイプ 患者-健常者)。

このハプロタイプを *-B51* 陽性、陰性で階層分けして検定すると、*-B51* 陽性者で相関を示し ($p_{(x,y)}=0.00006$, OR=1.83)(表 2-ハプロタイプ *-B51* 陽性患者-健常者)、*-B51* 陰性者においても相関を示した ($p_{(x,y)}=0.001$, OR=1.67)(表 2-ハプロタイプ *-B51* 陰性患者-健常者)。*-A26*

陽性、陰性で階層分けして検定を行うと、*-A26* 陽性者で強い相関を示した ($p_{(x,y)}=4.78E-15$, OR=3.48)(表 2-ハプロタイプ *-A26* 陽性患者-健常者)のに対し、*-A26* 陰性者では相関を示さなかった(表 2-ハプロタイプ *-A26* 陰性患者-健常者)。

また、健常者における *-A26* の一般的な頻度より健常者における *-A26* 陽性者数と陰性者数を推定して検定を行い、パーチェット病と相関することを確認し ($p_{(x,y)}=3.02E-10$, OR=2.25)(表 2-*-A26* 患者-健常者)、強い相関を示した *-A26* 陽性階層下と比較解析を行ったところ、*-A26* 陽性で階層下の示す値が $p_{(x,y)}$ 値は約 2×10^{-5} 低く、オッズ比は 1.5 倍以上高かった。また、*-A26* とこのハプロタイプとの連鎖不平衡値は $D'=0.69$, $r^2=0.24$ と、弱い連鎖不平衡にあった。

C. 考察

rs2517646, rs2844787 が相関を示したことから *TRIM10*, *TRIM15* は両遺伝子ともパーチェット病に関連することを示唆した。また、パーチェット病と両 SNP の存在するハプロタイプで検定を行った検定結果は各 SNP で行った検定結果より強い相関を示したことから、両 SNP は何らかの相互作用をしてパーチェット病と関連することを示唆した。

このハプロタイプを *-B51* 陽性、陰性で階層分けをして検定した結果より、陽性者だけでなく陰性者においても相関を示したことから、このハプロタイプは *-B51* とは独立してパーチェット病と関連することを示唆した。また、*-A26* 陽性、陰性で階層分けして検定した結果より、*-A26* 陽性者で相関を示したのに対し、*-A26* 陰性者では相関を示さなかったことと、*-A26* における相関の強さより強く相関したことから、このハプロタイプは *-A26* と何らかの相互作用をしてパーチェット病と関連するこ

とを示唆した。この相互作用の可能性、各 SNP の機能について今後検討する必要がある。

HLA-A と rs2517646 は約 210 kbp 離れた位置にありながら連鎖不平衡にあることから、このハプロタイプ近傍に他の感受性多型が存在する可能性が高い。*HLA-A* と *-B* の間には *HLA-E* という *HLA* 遺伝子が存在するが、*-A* と *-E* の間の領域には発現可能な遺伝子が 12 個存在し、このうち本研究でベーチェット病との関連が示唆された *TRIM10*, *TRIM15* 以外に 4 個の機能不明な *TRIM* 遺伝子が存在する。またこの領域の遺伝的多様性は未だ明らかにされていない。これらのことから、*HLA-A* から *-E* の間に対象領域を広げて SNP 関連解析を行いたい。

E. 結論

HLA-B51 陽性者と陰性者間で有意差を示したマイクロサテライト D6S1130i の両側に位置する *TRIM10*, *TRIM15* がベーチェット病と関連することを示唆した。しかし、両遺伝子近傍の遺伝的多様性が明らかにされていない領域中にも感受性多型が存在する可能性が充分にあることから、ベーチェット病感受性ゲノム領域の 1 つである *HLA* 領域について SNP 関連解析を進める必要がある。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yabe T, Matsuo T, Hirayasu K, Kashiwase K, Kawamura-Ishii S, Tanaka H, Ogawa A, Takanashi M, Satake M, Nakajima K, Tokunaga K, Inoko H, Saji H, Ogawa S, Juji T, Sasazuki T, Kodera Y, Morishima: Donor killer immunoglobulin-like receptor (KIR) genotype-patient cognate KIR ligand combination and antithymocyte globulin preadministration are critical

factors in outcome of HLA-C-KIR ligand-mismatched T Cell-replete unrelated bone marrow transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation (BBMT)* 14: 75-87, 2008.

2. Hui J, Oka A, James A, Palmer LJ, Musk AW, Beilby J, Inoko H: A genome-wide association scan for asthma in a general Australian population. *Hum Genet* 123: 297-306, 2008.
3. 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: 725-727, 2008.
4. Ohtsuka M, Inoko H, Kulski JK, Yoshimura S: Major histocompatibility complex (Mhc) class Ib gene duplications, organization and expression patterns in mouse strain C57BL/6. *BMC Genomics* 9:178-192, 2008
5. Kimura T, Kobayashi T, Munkhbat B, Oyungerel G, Bilegtsaikhan T, Anar D, Jambaldorj J, Munkhsaikhan S, Munkhtuvshin N, Hayashi H, Oka A, Inoue I, Inoko H: Genome-wide association analysis with selective genotyping identifies candidate loci for adult height at 8q21.13 and 15q22.33-q23 in Mongolians. *Hum Genet* 123: 655-660, 2008.
6. Ando A, Uenishi H, Kawata H, Tanaka-Matsuda M, Shigenari A, Flori L, Chardon P, Lunney JK, Kulski JK, Inoko H: Microsatellite diversity and crossover regions within homozygous and heterozygous SLA haplotypes of different pig breeds. *Immunogenetics* 60: 399-407, 2008.
7. Holland LZ, Albalat R, Azumi K, Benito-Gutiérrez E, Blow MJ, Bronner-Fraser M, Brunet F, Butts T, Candiani S, Dishaw LJ, Ferrier DE, Garcia-Fernández J, Gibson-Brown JJ, Gissi C, Godzik A, Hallböök F, Hirose D, Hosomichi K, Ikuta T, Inoko H, Kasahara M, Kasamatsu J, Kawashima T, Kimura A, Kobayashi M, Kozmik Z, Kubokawa K, Laudet V, Litman GW, McHardy AC, Meulemans D, Nonaka M, Olinski RP, Pancer Z, Pennacchio LA, Pestarino M, Rast JP, Rigoutsos I, Robinson-Rechavi M, Roch G, Saiga H, Sasakura Y, Satake M, Satou Y, Schubert M, Sherwood N, Shiina T, Takatori N, Tello J, Vopalensky P, Wada

- S, Xu A, Ye Y, Yoshida K, Yoshizaki F, Yu JK, Zhang Q, Zmasek CM, de Jong PJ, Osoegawa K, Putnam NH, Rokhsar DS, Satoh N, Holland PW: The amphioxus genome illuminates vertebrate origins and cephalochordate biology. *Genome Res* 18: 1100-1111, 2008.
8. 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: 4453-4457, 2008.
9. Kulski JK, Shigenari A, Shiina S, Ota M, Hosomichi K, James I, Inoko H: Human endogenous retrovirus (HERVK9) structural polymorphism with haplotypic HLA-A allelic associations. *Genetics* 108: 446-457, 2008.
10. Takemoto Y, Naruse T, Namba K, Kitaichi N, Ota M, Shindo Y, Mizuki N, Gul A, Madanat W, Chams H, Davatchi F, Inoko H, Ohno S, Kimura A: Re-evaluation of heterogeneity in HLA-B*510101 associated with Behçet's disease. *Tissue Antigens* 72: 347-353, 2008.
11. Sumiyama D, Kitamura S, Terasawa F, Hori Y, Murata K, Kulski JK, Inoko H: Paternity determination of captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) using microsatellite DNA analysis. *J Vet Med Sci* 70: 711-713, 2008.
12. Hosomichi K, Miller MM, Goto RM, Wang Y, Suzuki S, Kulski JK, Nishibor20 M, Inoko H, Hanzawa K, Shiina T: Contribution of mutation, recombination, and gene conversion to chicken MHC-B haplotype diversity. *J Immunol* 181:3393-3399, 2008.
13. 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 NAKiyama 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.

14. Kulski JK, Shigenari A, Shiina T, Ota M, Hosomichi K, James I, Inoko H: Human endogenous retrovirus (HERVK9) structural polymorphism with haplotypic HLA-A allelic associations *Genetics* 180: 445-457, 2008.

2. 学会発表

1. 倉田里穂, 齊藤卓磨, 細道一善, 目黒明, 水木信久, 椎名隆, 井ノ上逸朗, 猪子英俊, ベーチェット病感受性ゲノム領域に位置する *TRIM* 遺伝子群の SNP 関連解析. 第 31 回日本分子生物学会. 2008.

H. 知的財産権の出願, 登録状況

特記事項なし.

表1. 各SNPの患者-対照関連解析

	HWE	χ^2	p-value (χ^2)	OR	95%CI
rs2257914	0.05	4.42	0.04	0.75	0.57-0.98
rs2285795	0.42	1.29	0.26	0.87	0.69-1.10
rs3734840	0.06	2.31	0.13	1.20	0.95-1.51
rs2517646	0.04	11.86	0.0006	1.52	1.19-1.93
rs9261535	0.01	1.06	0.30	0.85	0.62-1.15
rs2523733	0.02	0.06	0.81	0.96	0.71-1.28
rs2074476	0.91	2.17	0.14	0.80	0.59-1.07
rs929156	0.00002	0.002	0.97	1.00	0.76-1.32
rs2844787	0.08	11.88	0.0006	1.52	1.20-1.95

表2. 検定結果

Haplotype	Frequency	Frequency	χ^2	p-value (χ^2)	OR	95%CI
ハプロタイプ 患者健康者						
Haplotype 1	0.68	0.79	18.81	0.00001	1.75	1.43-2.16
Haplotype 2	0.32	0.21				
ハプロタイプ 対症性患者健康者						
Haplotype 1	0.67	0.79	16.20	0.00006	1.83	1.39-2.47
Haplotype 2	0.33	0.21				
ハプロタイプ 対症性患者健康者						
Haplotype 1	0.69	0.79	10.53	0.001	1.87	1.22-2.29
Haplotype 2	0.31	0.21				
ハプロタイプ 対症性患者健康者						
Haplotype 1	0.52	0.79	81.35	4.70E-15	3.48	2.50-4.84
Haplotype 2	0.48	0.21				
ハプロタイプ 対症性患者健康者						
Haplotype 1	0.80	0.79	0.11	0.74	0.94	0.69-1.29
Haplotype 2	0.20	0.21				
対症性健康者						
患者	0.36	0.64	39.68	3.02E-10	2.25	1.74-2.93
健康者	0.20	0.80				

世若群



陸奥若群



Group: Group1
 Lower left: D'-value 0
 Upper right: r-square 0
 Sub-Group: D'-value 1-0.9

DR, SNP1-117 GLD Map

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

分担研究報告書

ペーチェット病に関する調査研究

研究協力者 太田正穂 信州大学医学部法医学教室

ペーチェット病における疾患感受性候補遺伝子 *ROBO1* の SNP 解析

太田正穂：信州大学医学部法医学教室

勝山善彦：信州大学付属病院薬剤部

目黒明、水木信久：横浜市立大学大学院視覚器病態学

南場研一、大野重昭：北海道大学医学部視覚器病学

岡晃、猪子英俊：東海大学分子生命科学遺伝情報部門

研究要旨

ペーチェット病(BD)の疾患感受性遺伝子には、人種差を超えて HLA-B51 遺伝子が報告されているが、それ以外の遺伝子の関与も示唆されている。そこで、我々は全ゲノムを網羅するマイクロサテライトを用いた疾患感受性遺伝子スクリーニングを行い、感受性候補遺伝子を幾つか検出した。今回、3 番染色体 3p12 に位置するマイクロサテライトマーカー D3S0186i と有意な相関を示した近傍の遺伝子 *ROBO1* の疾患感受性について検討した。*ROBO1* 遺伝子内に 14 種類の SNP を設定し、ペーチェット病感受性の相関解析を行ったところ、D3S0186i から約 248 kb 離れた位置にある SNP(rs7653782) と抵抗性の相関を示した($P=0.02$, $R.R=0.45$)。更に 14 種の SNP s 間におけるハプロタイプブロック構造を調べると、rs6779556-rs7653782 の LD (連鎖不平衡) 値が患者群と対照群で著しく異なっていた。すなわち、健常者群では両 SNP s 間では連鎖不平衡が強いが、患者群では連鎖が弱い値を示した。この 2 つの SNP s の推定ハプロタイプについて相関解析を行ったところ、TC 或いは GT ハプロタイプが統計学的有意($R.R.>6.7$, $p<1.6\times 10^{-6}$)な疾患感受性を示した。これは 2 個の SNP が位置するイントロン 9 からエクソン 18 において患者群と対照群では疾患感受性に影響する塩基配列の相違が示唆される。

ROBO1 分子の機能的な解析は未だ明らかにされていないが、今回有意差が観察された領域内の遺伝子構造解析とペーチェット病感受性との更なる検討が必要と考える。

A. 研究目的

ペーチェット病は内的遺伝因子としては HLA-B51 対立遺伝子が発症要因の一因とされているが、疾患発症に関わる HLA-B51 遺伝子以外の遺伝子の検索も必要とされている。これまで、我々は全ゲノムを網羅するマイクロサテライトマーカー 23,465 個を用いて、ゲノムワイドに疾患感受性遺伝子スクリーニングを行い幾つかの候補遺伝子を絞り込んだ。そのなかで 3 番染色体 3p12 に局在する D3S0186i は 3 回の pooled DNA スクリーニングで $P < 0.0001$ の有意差をもって疾患感受性を示した。今回、このマイクロサテライトに近接した *ROBO1* (Roundabout) 遺伝子内に設けた 14 種類の SNPs を用いて、ペーチェット病における疾患感受性を検討した。

B. 研究方法

- ① 横浜市立大学附属病院眼科または北海道大学附属病院眼科にて、ペーチェット病と診断された患者さん 200 人の DNA と健常人 191 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承認を得たものである。
- ② 解析に用いた *ROBO1* 遺伝子内 SNPs と型判定
今回解析に用いた SNPs は、*ROBO1* 遺

伝子内約 950 Kb 間に一定の間隔で設定したものである (図 1)。何れの SNPs も日本人におけるハップマップデータベースにて多型性を示したものを選出した。

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

マイクロサテライトを用いたゲノムワイドな相関解析でペーチェット病と相関を示した D3S0186i は *ROBO1* 遺伝子内に存在する。今回 *ROBO1* 遺伝子約 950 Kb 間に設けた 14 種類の SNPs (図 1) を用いてペーチェット病との相関を解析したところ、表 1 のように D3S0186i から約 248 Kb 離れた SNP (rs7653782) と有意差 ($p=0.02$) を示したが、Bonferroni の補正を行うと有意差は消失した。

また、14 種類の SNPs によるハプロタイプ LD ブロックを Haploview (<http://www.borad.mit.edu/haploview/>) ソフトを用いて患者群と対照群について作成すると、少なくとも *ROBO1* 遺伝子内に 4 個以上の LD ブロックが見られた (図 2)。D3S0186i の両側に設けた 73.6 Kb 間の SNPs (rs328047, rs328048, rs6548601) は、お互いに連鎖不平衡が強く、1 つのハプロタイプブロックを作り、患者群と対照群とにおいて有意差は認められなかった。

しかし、図1のハプロタイプのLDブロック構造を患者群と対照群と比較すると、相関解析で有意差を示した

SNP3(rs7653782)とSNP2(rs6795556)とのLD値が両群で著しく異なっていた。そこで、この2つのSNPsによる推定ハプロタイプ頻度を求め、相関解析を行うとマイナーハプロタイプTCとGTで強い相関($P < 1.6 \times 10^{-6}$, R.R. > 6.7)を示した(表2)。これは患者群と健常者において、SNP2の位置するROBO1遺伝子イントロ9からSNP3のエクソン18にいたる凡そ19.9Kb間に、疾患感受性に関わる遺伝子配列の構造的相違が示唆される。

神経の軸索を誘導する遺伝子Axon Guidance Receptor Gene (*ROBO1*)は、神経細胞接着分子のレセプターを制御している遺伝子であるが¹⁾、一方癌抑制候補遺伝子とも言われ²⁾、肝細胞癌で特異的な発現亢進が見られることから癌マーカーとしての有用性が指摘されている³⁾。このように神経細胞接着分子レセプターファミリーの一員であるROBO1は、神経や癌における疾患との関連が報告されているが、未だその機能については不明なことが多い。今後、ベーチェット病においてこの分子が機能的にどのように関与しているか、感受性を示したROBO1遺伝子内領域を中心に検討する必要があると思われる。

D. 参考文献

1) Kidd T, Brose K, Mitchell KJ, et al.

Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. *Cell* 92:205-215, 1998.

2) Dallol A, Forgacs E, Martinez A, et al. Tumor specific promoter region methylation of the human homologue of the Drosophila Roundabout gene DUTT1(ROBO1) in human cancers. *Oncogene* 21:3020-3028, 2002.

3) Ito H, Funahashi S, Yamauchi N, et al. Identification of ROBO1 as a novel hepatocellular carcinoma antigen and a potential therapeutic and diagnostic target. *Clin Cancer Res.* 12:3257-3264, 2006.

E. 健康危険情報 特記事項なし

F. 論文発表

1. Takemoto Y, Naruse T, Namba K, Kitaichi N, Ota M, et al. Re-evaluation of heterogeneity in HLA-B*510101 associated with Behcet's disease. *Tissue Antigens*, 2008.

2. Kulski JK, Shigenari A, Shiina T, Ota M, et al. Human Endogenous Retrovirus (HERVK9) Structural Polymorphism with Haplotypic HLA-A Allelic Associations. *Genetics*, 180:445-457, 2008.

3. 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. *Brit J Ophthalmology*, 92:1293-1296, 2008
4. Shibuya E, Meguro A, Ota M, et al. Association of toll-like receptor 4 gene polymorphisms with normal tension glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 49:4453-4457, 2008
5. 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*. (PMID18535602), 2008
6. Meguro A, Ota M, Katsuyama Y, et al. Association of the toll-like receptor 4 gene polymorphisms with Behcet's disease. *Ann Rheum Dis*. 67:725-727, 2008.
7. Ota M, Fukushima H, Kulski JH, Inoko H. Single nucleotide polymorphism detection by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Nature Protocols*. 2:2857-2864, 2007.
- G 知的財産権の出願・特許状況
なし

図1 SNPsの位置と各SNP間の距離

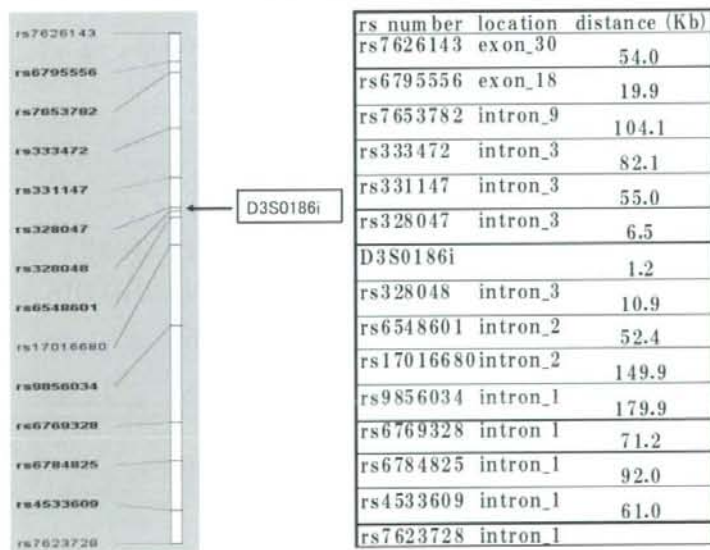


表1 *ROBO*遺伝子内SNPsとの相関

SNP rs	Allele	Patient n=200 (%)	Control n=191 (%)	R.R.	p
rs7626143	G	121(60.5)	115(60.2)	1.01	0.95
	T	168(84.0)	165(86.4)	0.83	0.51
rs6795556	G	173(86.5)	176(92.1)	0.55	0.07
	T	106(53.0)	113(59.2)	0.78	0.22
rs7653782	C	174(87.0)	179(93.7)	0.45	0.02
	T	106(53.0)	111(58.1)	0.81	0.31
rs333472	C	125(62.5)	126(66.0)	0.86	0.47
	T	167(83.5)	160(83.8)	0.98	0.94
rs331147	G	112(56.0)	109(57.1)	0.96	0.83
	T	173(86.5)	166(86.9)	0.96	0.90
rs328047	A	181(90.5)	171(89.5)	1.11	0.75
	G	112(56.0)	95(49.7)	1.29	0.21
D3S0186i					
rs328048	C	174(87.0)	162(84.8)	1.20	0.53
	G	117(58.5)	120(62.8)	0.83	0.38
rs6548601	A	184(92.0)	175(91.6)	1.05	0.89
	G	99(49.5)	81(42.4)	1.33	0.16
rs17016680	A	175(87.5)	168(88.0)	0.96	0.89
	G	113(56.5)	108(56.5)	1.00	0.99
rs9856034	A	120(60.0)	115(60.2)	0.99	0.97
	G	173(86.5)	163(85.3)	1.10	0.74
rs6769328	A	191(95.5)	173(90.6)	2.21	0.05
	G	76(38.0)	82(42.9)	0.81	0.32
rs6784825	C	146(73.0)	145(75.9)	0.86	0.51
	T	152(76.0)	149(78.0)	0.89	0.64
rs4533609	C	193(96.5)	185(96.9)	0.89	0.84
	T	71(35.5)	68(35.6)	1.00	0.98
rs7623728	C	131(65.5)	142(74.3)	0.66	0.06
	T	168(84.0)	161(80.5)	0.98	0.94

表2 SNP 2(rs6795556)-SNP 3(rs7653782) ハプロタイプとの相関

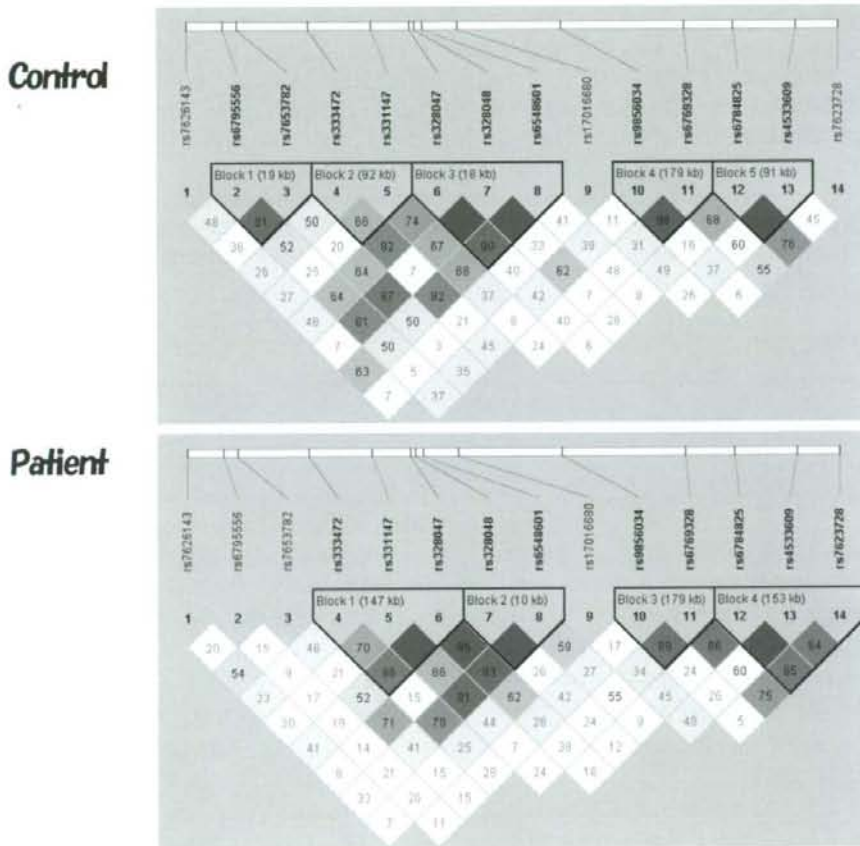
SNP 2-3 Haplotype	Patient n=200 (%)	Control n=191 (%)	R.R.	P
GC	96(48.1)	123(64.6)	0.51	0.0011
TT	29(28.8)	58(30.3)	0.39	0.00016
TC	38(18.9)	6(3.2)	6.76	1.6×10^{-6} *
GT	37(18.6)	4(1.9)	9.58	2.9×10^{-7} *

推定ハプロタイプと頻度はHaploview (<http://www.broad.mit.edu/haploview/>)より求めた。

*: Yeatsの補正値

2x4分割 χ^2 検定: $P=1.09 \times 10^{-12}$

図2 *ROBO1* 遺伝子内SNPのハプロタイプ構造



研究要旨

ベーチェット病(BD)は皮膚・粘膜・眼などの多臓器を侵襲する原因不明の難治性炎症性疾患であり、病態として自然免疫の関与やリンパ球・好中球などの獲得免疫の異常が関与している。これまでFicolin2 遺伝子多型(-557 領域, -64 領域)頻度が HLAB51 陽性・陰性 BD 患者間で有意差を生じ FCN2 の関与を報告した。今回リンパ球の機能異常を解明する目的で、BD 患者、健康人において、IL-7receptor(R) 遺伝子(promoter -1085 領域)多型頻度について解析した。この結果、BD 患者の IL-7R(-1085 領域)allele 頻度は、A allele 72 名、G allele 8 名であり、健康人では A allele 74 名、G allele 6 名であった。Genotype 頻度、allele 頻度において両者間に有意差を認めなかった。また完全型、不全型の両群間で有意差を認めなかった。この領域(-1085 領域)における病態との関連は少ないと考えられた。今後 IL-7R 遺伝子の他の領域(-449)に関しての多型解析が必要であると考えられた。

研究協力者：

滝口光次郎 埼玉医科大学皮膚科助教
水木信久 横浜市立大学眼科教授

A. 研究目的

ベーチェット病(BD)は皮膚・粘膜・眼などの多臓器を侵襲する原因不明の難治性炎症性疾患であり、その病因として、HLA-B51 などの遺伝子背景や、リンパ球・好中球などの過敏状態が病態の悪化に関与している。これまで自然免疫の関与として Ficolin2 遺伝子多型頻度(-557 領域, -64 領域)が HLAB51 陽性・陰性群の BD 患者間で有意差を生じ Ficolin2 の関与が存在することを報告した(表1)。

さらに獲得免疫の異常から本疾患を考えた場合、Th1/Th2 細胞のサイトカインの異常が存在し、Th1 細胞の活性化による IFN- γ 産生亢進が病態、さらに皮膚病変の形成・悪化に関与している。IL-7 は皮膚では表皮ケラチノサイトより産生され、T 細胞増殖に関与するサイトカインである。IL-7 は第 5 染色体に属している。BD における IL-7 の機能異常を明らかにする目的で IL-7R 遺伝子多型について解析した。

B. 方法：

BD 患者(45 名)、健康人(40 名)において、IL-7receptor(R)- α 遺伝子(-1085 領域)多型頻度について、PCR-RFLP 法を用いて解析した。

C. 結果：

BD 患者の IL-7R(-1085 領域)遺伝子多型 allele 頻度については、A allele 72 名、G allele 8 名であり、健康人では A allele 74 名、G allele 6 名であった。また Genotype 頻度に関して BD 患者で TT 群 37 名、GT

群 8 名、健康人 TT 群 34 名、GT 群 6 名で両者間に有意な差は認めなかった。

D. 考察：

BD で認められる皮膚病変として、結節性紅斑ではリンパ球を混じる脂肪織炎を生じ血管周囲へのリンパ球浸潤を認める。また潰瘍部位では表皮の破壊、真皮へのリンパ球浸潤を認め、組織炎症反応や組織障害に活性化リンパ球が関与している。IL-7 は T 細胞の増殖活性に関与するサイトカインで、リンパ節のみでなく、末梢組織におけるリンパ球の成熟増殖に関与している。BD 患者の皮膚病変の炎症形成に IL-7 がどのようにかかわっているかを解析するために、今回 BD 患者の IL-7R の遺伝子多型頻度について解析した。この結果、IL-7R(-1085 領域)遺伝子多型(G/T)allele 頻度、genotype 頻度は健康人と比べて有意差は認めず、また HLAB51 間においても有意差は認めなかった。以上よりこの領域における病態との関連は少ないと考えられた。今後 IL-7R 遺伝子の他の領域に関しての多型解析が必要であると考えられた。

E 結論：

BD 病の病態には、感染、疲労、ストレス、寒冷などの関与があり、免疫学的に NK 細胞や感染レクチン機能異常など自然免疫の関与があるが、T 細胞を中心とした獲得免疫が皮膚病変の形成・病態にも関与する。IL-7R(-1085)領域の遺伝子多型頻度に関してさらに他領域に関する頻度の検討が必要であると考えられた。

F. 研究発表

(論文発表)

なし

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

表1.

BD(n=83) HLAB51陽性、陰性群での
FCN2のSNP解析 (promoter, exon8領域) (allele)

type SNPs	BD (n=83) allele				p
	HLA-B51(-) N=37		HLA-B51(+) N=46		
-887	G 66(89.2)	A 8(10.8)	G 83(90.2)	A 9(9.8)	0.83
-602	G 67(90.5)	A 7(9.5)	G 89(96.7)	A 3(3.3)	0.10
-557	A 58(78.4)	G 16(21.6)	A 84(91.3)	G 8(8.7)	0.02*
-64	A 59(79.7)	C 15(20.3)	A 84(91.3)	C 8(8.7)	0.03*
-4	A 73(98.6)	G 1(1.4)	A 87(94.6)	G 5(5.4)	0.16
+6359	C 73(98.6)	T 1(1.4)	C 88(95.7)	T 4(4.3)	0.26
+6424	G 83(85.1)	T 11(14.9)	G 83(90.2)	T 9(9.8)	0.32

表2.

IL-7Rα遺伝子多型(-1085)頻度

Genotype頻度	-1085	健常人(40)	ベーチェット病(45)
	T/T		34
G/T		6	8
G/G		0	0
Allele頻度	-1085	健常人(40)	ベーチェット病(45)
	T	74	82
G	6	8	

(genotype: control vs BD: p=0.78)
(allele: control vs BD: p=0.79)

表3.

IL-7Rα遺伝子多型(-1085)頻度
(完全型・不全型での比較)

Genotype頻度	-1085	完全(23)	不全(22)
	T/T		11
G/T		5	2
G/G		0	0
Allele頻度	-1085	完全(23)	不全(22)
	T	41	42
G	5	2	

(genotype: control vs BD: p=0.11)
(allele: control vs BD: p=0.43)

ペーチェット病における炎症に関与している細菌抗原に関する研究

分担分担者 小熊恵二 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
横田憲治 岡山大学医学部保健学科
綾田 潔 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
申 蓮花 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

研究要旨

患者さんより分離した *S. sanguinis* 様菌である 113-20 株より、NOMO-1 細胞より IL-8 や TNF- α の産生を誘導するタンパク質を精製した。このタンパク質の遺伝子をクローニングし、その全塩基配列を決定したところ、これは Histidine-containing phosphocarrier protein (HPr) であることが判明した。BD 患者は HPr に対する IgA 抗体価が、BD 既往歴なしの人より高く、また、113-20 株による HPr の培養上清中への分泌量は、他の *Streptococci* より著しく大きかった。さらに、HPr は TLR-2 と -4 を介してシグナルを mitogen-activated protein (MAP) キナーゼカスケードに伝達し、IL-8、TNF- α の産生を誘導することが判明した。以上のことより、113-20 株では HPr を分泌し、単球より IL-8 や TNF- α の産生を誘導し、BD の病因に関与していることが示唆された。

A. 研究目的

我々は、ペーチェット病（以下 BD）患者から ATCC 基準株である *S. sanguinis* と抗原性の異なる 113-20、114-23、118-1 株の菌を分離し、患者との免疫反応や、菌の病原因子について報告してきた。今までの研究で BD 患者血清中の 113-20 株の cell lysate に対する IgA 抗体価が BD 既往歴なしの人に比べて高く、患者リンパ球や単球系培養細胞からの IL-8 産生を強く誘導することが判明した。今回は IL-8 産生に関わる抗原を精製し、その機序を解明した。また、BD 患者血清中の IgA 抗体価を分析した。

B. 研究方法

1) 産生誘導物質の精製

BD 患者由来の株（113-20、114-23、118-1）3 株と口腔内細菌の基準株である *S. sanguinis* (ATCC10556)、*S. oralis* (ATCC10557)、*S. salivarius* (ATCC7073)、*S. pyogenes* (WHO-T12) 4 株の計 7 種類の菌株を Todd-Hewitt 培地で培養し、遠心により集菌した後、ホモゲナイザーで破碎し、超遠心によ

り細胞質分画 (cell lysate) を得た。この 113-20 株の cell lysate 分画より、硫酸沈殿とカラムクロマトグラフィーにより、NOMO-1 細胞より IL-8 の産生を誘導するタンパク質を精製した。

2) タンパク質の同定

得られたタンパク質の N 末端の配列を同定したところ、HPr と推察されたので、既存の *S. sanguinis* の HPr 遺伝子の塩基配列の報告から、そのプライマーを合成し、113-20 菌 DNA より遺伝子を PCR で増幅した。次いで、その遺伝子をクローニングし全塩基配列を決定した。

3) HPr の機能の解析

精製 HPr に対する抗体をウサギで作製した後、上記菌の培養液中に存在する HPr の量を Western blot 法により測定した。また、HPr 処理により NOMO-1 細胞から産生される IL-8 や TNF- α の量は市販の抗体を用いた ELISA にて測定した。その産生機序の解析は、Tool like receptor (TLR)-2、-4 などに対するモノクローナル抗体による産生誘導の抑制や、mitogen-activated protein (MAP) キナーゼカスケードの特定のシグナルタンパク質のリン酸化の測定、およびカスケードに対する特定の阻害剤の影響の解析などにより行った。

4) HPr と BD 患者 111 人と健常人 40 名

の血清との反応 (IgA 抗体価) は ELISA にて測定した。

(倫理面への配慮)

抗体価測定の血清は、番号管理し個人特定は出来ないように管理した。

C. 研究結果

113-20 の cell lysate を 40% 硫酸処理した後、カラムを用いることにより、NOMO-1 から IL-8 や TNF- α の産生を亢進する分子量 16 万のタンパク質が精製された。N 末端のアミノ酸配列からこのタンパク質は HPr と推察されたので、その遺伝子を PCR で増幅した後、クローニングし、全塩基配列を決定し、HPr であることを確定した。この精製 HPr に対する患者の IgA 抗体価は、BD 既往歴なしの人より高く、これと Cell Lysate に対する抗体価との間では高い相関関係が認められた。また、培養上清中への 113-20 株による HPr の分泌量は、他の Streptococci より著しく大きかった。HPr を NOMO-1 に作用すると、MAP キナーゼカスケードの ERK1/2 と p38 MAPK のリン酸化が亢進され、IL-8、TNF- α の産生が誘導された。このサイトカイン産生は TLR-2 と -4 に対する抗体や、U0126 と SB20358 という阻害剤で阻害された。

D/E. 考察と結論

113-20 株は他のレンサ球菌よりも多くの量の HPr を培養上清中へ分泌し、単球の TLR-2 と -4 を介してシグナルを MAP キナーゼカスケードに伝達し、IL-8、TNF- α の産生を誘導することにより、BD の病因に関与していることが示唆された。

F. 特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kaneko F, Oyama N, Yanagihori H, Isogai E, Yokota K, Oguma K. The role of streptococcal hypersensitivity in the pathogenesis of Behcet's Disease. Eur J Dermatol. 18, 489-498, 2008.

2. 学会発表

1. 日本細菌学会総会 (日本細菌学雑誌 Vol. 63 (1), 127, 2008)
2. 日本感染症学会総会 (感染症学雑誌 Vol. 82, 304, 2008)
3. Lancefield レンサ球菌研究会 (2008)

H. 知的所得権の取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得
特記事項なし
2. 実用新案登録
特記事項なし
3. その他

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

熱ショック蛋白誘発ぶどう膜炎モデルの試作

分担研究者	蕪城俊克	東京大学医学部眼科学教室
研究協力者	高本光子	東京大学医学部眼科学教室
	冲永貴美子	関東中央病院眼科
	玉島順子	東京大学医学部眼科学教室
	藤野雄次郎	東京厚生年金病院眼科
	沼賀二郎	東京都老人医療センター眼科
	川島秀俊	さいたま赤十字病院眼科

研究要旨

[目的] ペーチェット病患者において、熱ショック蛋白 (Heat shock protein, HSP) に対する免疫反応が惹起されている可能性が示唆されている。今回、ラットおよびマウスにおいて熱ショック蛋白誘発ぶどう膜炎モデルの試作を試みた。[方法] Lewis ラットと C57BL/6N マウスについて、以下の方法でぶどう膜炎が発症するかを検討した。①皮下注射モデル：HSP ペプチド(HSP336-351) 100 μ g をアジュバンドと混合して皮下注射した。同日および7日目に百日咳菌懸濁液を 0.1ml 腹腔内注射した。②内服モデル：HSP ペプチド 100 μ g を6回 (0, 2, 4, 6, 8, 10日目) に内服投与した。[結果] ラット皮下注射モデルでは、3匹中3匹に免疫後18日目に軽度の虹彩炎が認められた。眼底には明らかな炎症所見はみとめなかった。ラット内服モデルでは今のところ明らかな炎症所見は確認できていない。マウス皮下注射モデルでは2回目の注射後に殆どのマウスが死亡した。マウス内服モデルでは免疫後25日目に4匹中1匹に軽度の虹彩炎が認められた。[結論] Lewis ラットへのHSP ペプチドの皮下注射により病理学的な虹彩炎の発症が確認された。C57BL/6N マウスではぶどう膜炎の発症は起きなかった。

A. 研究目的

ペーチェット病は、口腔内アフタ、眼病変、外陰部潰瘍、皮膚症状を主体とした全身性炎症性疾患で、眼症状としては再発性ぶどう膜炎を呈し、急性のぶどう膜炎を繰り返す特徴がある。ペーチェット病の発症機序として、HLA-B51をはじめとする免疫遺伝学的な素因¹⁾に加え、炎症の引き金を引く何らかの外的因子の存在が推定されてきた。一方、ペーチェット病における免疫機能の異常として、好

中球の遊走能の亢進²⁾、活性酸素産生亢進³⁾、末梢血中のCD8+T細胞、 γ δ T細胞の増加⁴⁾、あるいは末梢血好中球のapoptosisの抑制⁵⁾などが報告されてきた。これらの免疫異常から、ペーチェット病では何らかの外来抗原に対してT細胞が活性化し、それが産生するIL-8などのサイトカインが好中球を活性化させている可能性が推測されている²⁾。その外来抗原として、ペーチェット病患者の口腔内から分離された血清学的に特殊なStreptococcus sanguinis⁶⁾、口腔内アフタの

原因となりうる単純ヘルペスウイルス⁷⁾、さらに細菌やヒトの熱ショック蛋白 (heat shock protein, HSP)⁷⁾などの可能性が報告されている。特に、ペーチェット病と HSP の関連性に関しては、ペーチェット病患者の血清において *Micobacterium* 65kD-HSP に対する IgA が上昇していること⁸⁾、ペーチェット病患者の末梢血リンパ球はヒト HSP336-351 ペプチド刺激により有意な増殖を起こすこと⁹⁾、が報告されており、ペーチェット病患者が HSP 蛋白に対して免疫学的感作を受けていることを示唆する。

一方、ぶどう膜炎の動物モデルとして、実験的自己免疫的ぶどう膜炎 (experimental autoimmune uveitis, EAU)¹⁰⁾、エンドトキシン誘発ぶどう膜炎 (endotoxin induced uveitis, EIU)¹¹⁾、実験的メラニン誘発ぶどう膜炎 (experimental melanin-induced uveitis, EMIU)¹²⁾などがあるが、自己免疫疾患のぶどう膜炎モデルとしては EAU が主に用いられる。これは網膜特異抗原である可溶性抗原 (S 抗原) や Interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) などの蛋白あるいはその合成ペプチドを、完全フロイント・アジュバンドと混合してラットまたはマウスの皮下に注射すると、約 10 日から 2 週間後にぶどう膜炎を起す動物モデルである。本モデルでは高率にぶどう膜炎を発症させるためには、百日咳毒素の腹腔内注射を行って免疫を強める必要がある。そのため、実際のペーチェット病患者と EAU では、ぶどう膜炎の発症機序がかなり違う可能性が高いと推測する。

近年、HSP のペプチドを用いてラットにぶどう膜炎を起こす動物モデルが報告された。これには、ペプチドをアジュバンドと混合して皮下注射する方法¹³⁾と、ペプチドを繰り返して内服させる方法¹⁴⁾がある。特に後者のモデ

ルは、アジュバンドも百日咳毒素も用いることなく、1回 62.5 μ g という少ない量のペプチドを 5 回経口投与するだけで 75% のラットにぶどう膜炎を惹起出来るとしている。少量の細菌の HSP ペプチドでぶどう膜炎を起こしている点から、この動物モデルはペーチェット患者の病態に近い可能性がある。しかし、このモデルのぶどう膜炎発症機序については、CD4 陽性 T 細胞がぶどう膜炎の発症に、CD8 陽性 T 細胞は抑制に関与している可能性が示唆されているが¹⁴⁾、それ以上の解析は行われていない。特に、この動物モデルがペプチドの経口投与であるにも関わらず、Oral Tolerance を誘導することなく、ぶどう膜炎を惹起するののかについては、未だ明らかにされていない。この動物モデルの発症機序を検討することで、ペーチェット病の発症機序解析の手がかりが得られる可能性があると考えられる。今回、ラットおよびマウスに対して HSP ペプチドを用いた実験的ぶどう膜炎モデルを作成することを目標に研究を行った。

B. 研究方法

実験動物として Lewis ラット (7-9 週齢、オス) および C57BL/6 マウス (7-9 週齢、オス) を用いた。また、HSP 由来ペプチドとして、ヒト 60 (65) kD-HSP ペプチド (HSP336-351、QPHDLGKVGIVTKD) を用いた。免疫方法は、過去の報告に従って下記の 2 つの方法で行った。

①皮下注射モデル

まず、不完全フロイント・アジュバンド (BD Difco, No. 6038, USA) と *M. tuberculosis* (H37RA) (BD Difco, No. 3114, USA) を混和して 5mg/ml の完全フロイント・アジュバンド (CFA) を作成した。この CFA100 μ l と HSP ペプチド (HSP336-351) 溶液 100 μ g/100 μ l を体積比 1:1 で混和し、ラット、マウスとも 0

日目に1匹あたり200 μ lずつ(ペプチド量100 μ g)後頸部皮下に注射した。さらに、免疫を賦活化させるため、百日咳菌溶液(ナカライバイオケミカル、 1×10^{10} /ml)0.1mlの腹腔内注射を、ラットは0日目に1回、マウスは0日目および7日目の2回行った。

②内服モデル

HSP ペプチド液100 μ g/mlにTrypsin Inhibitor(type2-trypsin inhibitor from soybean, Sigma T-9128)2mgを溶解し、ラット、マウスとも0, 2, 4, 6, 8, 10日目(6回)に経口投与した。

細隙灯顕微鏡および眼底カメラを用いた眼内炎症の観察を1-2日毎に行った。ぶどう膜炎の発症を確認するために、ラットは免疫18日目、マウスは25日目にsacrificeし、HE染色による病理学的検討を行った。

(倫理面への配慮)

実験に使用した動物の取り扱いについては、Association for Research in Vision and Ophthalmologyの実験動物取り扱い規定に従った。

C. 研究結果

①ラットの皮下注射モデル

免疫12日目から虹彩血管の拡張、縮瞳をみとめた。細隙灯顕微鏡では明らかな炎症所見は確認できなかったが、病理学的には3匹中3匹で虹彩炎を発症していた(図1)。しかし眼底には臨床所見および病理学的所見ともに炎症は認めなかった。

②ラット内服モデル

臨床所見上、明らかな前房内炎症は観察できなかったが、病理学的には3匹中1匹にごく軽度の虹彩炎を認めた(図2)。眼底には臨床所見および病理学的所見ともに炎症は認めなかった。

③マウスの皮下注射モデル

この免疫を行ったマウス5匹中4匹は、7日目の2回目の百日咳菌注射の直後に死亡した。1匹のみ生存し、16日目にsacrificeして病理学的検査を行ったが、前房内、眼底ともに炎症所見は認めなかった。

④マウス内服モデル

臨床所見では20日目ごろから原因不明の網脈絡膜萎縮を検眼鏡的に認めた(図3)。しかし、25日目の病理像では4匹中1匹に病理学的に軽度の虹彩炎を認めたのみで、網脈絡膜には明らかな炎症像はみとめなかった(図4)。

D. 考察

HSPは細胞が熱などのストレスにさらされた際に発現が上昇し、分子シャペロンとして機能して細胞を保護するタンパク質の一群である。HSPの役割として、新しく作られたタンパク質に結合してタンパク質の折り畳み(folding)を制御し、立体構造を安定化させること、高温などにより変性したタンパク質に結合して、その分解処理に働くことが知られている¹⁵⁾。HSPの発現は細菌感染や炎症、エタノール、活性酸素、紫外線、低酸素状態などの細胞に対する様々なストレスにより誘導される。HSPはヒトから細菌に至るまで様々な生物種において広く発現して類似した機能を担っており、そのアミノ酸配列は生物の進化の過程においてよく保存されていることが知られている。

ペーチェット病患者でStreptococcus属の細菌に対して強い皮内反応が起きることから、ペーチェット病の病因にStreptococcus抗原が関与している可能性が指摘されてきた。しかし、多様な種類のStreptococcus属に対して過敏反応を起こすことから、細菌が持つ何らかの共通抗原が関連している可能性も考えられてきた¹⁶⁾。HSP

は殆どのグラム陽性細菌が発現しており、そのアミノ酸配列はヒト HSP とも高い類似性を持つ。ペーチェット病患者の血清中で *Micobacterium* 65kD-HSP に対する IgA の上昇がみられること⁸⁾、ペーチェット病患者の末梢血リンパ球はヒト HSP336-351 ペプチド刺激により有意な増殖を起こすこと⁹⁾、などから、ペーチェット病と HSP の関連性も推測されている。

今回の実験は、HSP ペプチドを用いた Lewis ラットでのぶどう膜炎モデル^{13,14)}の追試と同じ免疫方法による C57BL6 マウスでの検討を目的とした。今回の結果は、Lewis ラットで皮下注射を行った場合で、明らかな虹彩炎の発症を認めたが、過去の報告と比べて虹彩炎の程度は弱く、今後解析を進めるためにはぶどう膜炎がもっと強くなるように免疫方法やペプチドの量などを検討しなおす必要がある。ラットでのペプチド内服モデルに関しても、3 匹中 1 匹にわずかな虹彩炎の発症を認めたのみであった。この点に関しては、今回用いたペプチド液の内服方法が口腔内投与であったため、十分量のペプチドが消化管から吸収されなかった可能性がある。今後、内服方法に胃ゾンデを用いることや、ペプチド投与量を再検討することで、ぶどう膜炎の発症率を上げるように工夫を行っていく予定である。一方、今回の C57BL6 マウスでの実験では、皮下注射モデルで 2 回目の百日咳菌腹腔内注射の後に多くのマウスが死亡した。この原因は不明であるが、百日咳菌が持つ HSP に対して免疫反応が働いた可能性も考えられる。2 回目の百日咳菌注射の量を減らす、あるいは 2 回目の注射を行わない群での検討が必要であると考えられる。また、マウスの HSP ペプチド内服モデルでも明らかなぶどう膜炎の発症を認めなかった。今回用いたヒト HSP336-351 ペプチドは、B10Br マ

ウスの HLA と結合可能であるとの知見を得ている。今後は、C57BL6 マウスだけではなく B10Br マウスでのぶどう膜炎の発症も検討する予定である。

E. 結論

ラットおよびマウスにおいて熱ショック蛋白誘発ぶどう膜炎モデルの試作を試みた。Lewis ラットでは HSP ペプチドの皮下注射により虹彩炎の発症が確認された。C57BL/6N マウスではぶどう膜炎の発症は起きなかった。今後、マウスの種類を変えるなどしてマウスでの熱ショック蛋白誘発ぶどう膜炎モデルの作成を目指したいと考えている。

参考文献

- 1) Ohno S, Asanuma T, Sugiura S, et al: HLA-Bw51 and Behçet's disease. *JAMA* 1978; 240(6):529.
- 2) Yamashita N: Hyperreactivity of neutrophils and abnormal T cell homeostasis: a new insight for pathogenesis of Behçet's disease. *Int Rev Immunol* 1997; 14(1):11-9.
- 3) Efthimiou J, Addison IE, Johnson BV: In vivo leucocyte migration in Behçet's syndrome. *Ann Rheum Dis* 1989; 48(3):206-10.
- 4) Suzuki Y, Hoshi K, Matsuda T, Mizushima Y: Increased peripheral blood gamma delta+ T cells and natural killer cells in Behçet's disease. *J Rheumatol* 1992; 19(4):588-92.
- 5) Fujimori K, Oh-i K, Takeuchi M, Yamakawa N, Hattori T, Kezuka T, et al.: Circulating neutrophils in Behçet disease is resistant for apoptotic cell death in

the remission phase of uveitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008; 246(2):285-90.

6) Isogai E, Ohno S, Kotake S, Isogai H, Tsurumizu T, Fujii N, et al.: Chemiluminescence of neutrophils from patients with Behçet's disease and its correlation with an increased proportion of uncommon serotypes of *Streptococcus sanguis* in the oral flora. *Arch Oral Biol* 1990; 35(1):43-8.

7) Lehner T, Stanford MR, Phipps PA, Sun JB, Xiao BG, Holmgren J, et al.: Immunopathogenesis and prevention of uveitis with the Behçet's disease-specific peptide linked to cholera toxin B. *Adv Exp Med Biol* 2003; 528:173-80.

8) Lehner T, Lavery E, Smith R, van der Zee R, Mizushima Y, Shinnick T: Association between the 65-kilodalton heat shock protein, *Streptococcus sanguis*, and the corresponding antibodies in Behçet's syndrome. *Infect Immun* 1991; 59(4):1434-41.

9) Kaneko S, Suzuki N, Yamashita N, Nagafuchi H, Nakajima T, Wakisaka S, Yamamoto S, Sakane T: Characterization of T cells specific for an epitope of human 60-kD heat shock protein (hsp) in patients with Behçet's disease (BD) in Japan. *Clin Exp Immunol* 1997; 108(2):204-12.

10) Caspi RR: Experimental autoimmune uveoretinitis in the rat and mouse. *Curr Protoc Immunol* 2003 May;Chapter 15:Unit 15.6.

11) Herbort CP, Okumura A, Mochizuki M: Immunopharmacological analysis of

endotoxin-induced uveitis in the rat. *Exp Eye Res* 1989; 48(5):693-705.

12) Smith JR, Rosenbaum JT, Williams KA: Experimental melanin-induced uveitis: experimental model of human acute anterior uveitis. *Ophthalmic Res.* 2008; 40(3-4):136-40.

13) Stanford MR, Kasp E, Whiston R, Hasan A, Todryk S, Shinnick T, et al.: Heat shock protein peptides reactive in patients with Behçet's disease are uveitogenic in Lewis rats. *Clin Exp Immunol* 1994; 97(2):226-31.

14) Hu W, Hasan A, Wilson A, Stanford MR, Li-Yang Y, Todryk S, et al.: Experimental mucosal induction of uveitis with the 60-kDa heat shock protein-derived peptide 336-351. *Eur J Immunol* 1998; 28(8):2444-55.

15) Schlesinger MJ: "Heat shock proteins." *J Biol Chem* 1990; 265, 12111-4.

16) Lehner T: The role of heat shock protein, microbial and autoimmune agents in the aetiology of Behçet's disease. *Int Rev Immunol* 1997; 14(1):21-32.

F. 健康危険情報 特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kaburaki T, Koshino T, Kawashima H, Numaga J, Tomidokoro A, Shirato S et al. Initial trabeculectomy with mitomycin C in eyes of uveitic glaucoma with inactive uveitis. *Eye*. in press.

2) 蕪城俊克: ぶどう膜炎の最近の治療. 眼

科 2008; 50(4):435-443.

3) 大島由莉, 蕪城俊克, 藤村茂人, 川畑仁人, 吉田淳, 沼賀二郎, 藤野雄次郎, 川島秀俊: ステロイド大量療法とワーファリンによる厳密な抗凝固療法を行った網膜血管閉塞を伴う全身性エリテマトーデス網膜症の2例. 臨床眼科 2008; 62(3):399-405.

4) 蕪城 俊克: 特集「ぶどう膜炎検査の正しい使い方」 頭部 CT, MRI. あたらしい眼科 2008; 25(11):1505-1510.

5) 蕪城 俊克: ぶどう膜炎 1)原因不明の虹彩炎. in 眼科診療プラクティス 23「眼科薬物治療」、根木 昭 編集、文光堂、東京、2008, 126-127.

6) 蕪城 俊克: ぶどう膜および眼悪性腫瘍の手術. in 「看護のための最新医学講座」、水流 忠彦 編集、中山書店、東京、2008, 286-292.

7) 川島秀俊、蕪城 俊克: ぶどう膜疾患. P153-161 in 「看護のための最新医学講座」、水流 忠彦 編集、中山書店、東京、2008

8) 蕪城 俊克: 細隙灯顕微鏡検査のポイント. in 「眼科診療のスキルアップ 白内障・小児・ぶどう膜炎編」、黒坂次郎 編集、Medical View. 東京、2009, 138-143.

9) 相原一、蕪城俊克. 【眼科疾患アトラス】緑内障 虹彩後癒着とあんぱん虹彩(iris bombe). 眼科 2008; 50(10):1418-1419.

10) 沖永貴美子, 蕪城俊克, 高本光子, 荒木章之, 藤野雄次郎, 沼賀二郎, 川島秀俊: 硝子体液の抗体価高値で診断された眼トキシカラ症の一例. 帝京医学雑誌 2008; 31(6):331-334.

2. 学会発表

1. 玉島順子, 荒木章之, 高本光子, 藤村茂人, 蕪城俊克, 川島秀俊, 沼賀二郎, 藤野雄次郎: 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. 第 112 回日本眼科学会総会. 2008. 4. 東京

2. 荒木章之, 蕪城俊克, 高本光子, 吉田淳, 川島秀俊, 沼賀二郎, 藤野雄次郎, 新家眞: ぶどう膜炎続発緑内障に対するチモプトール XE とキサラタンの比較試験. 第 112 回日本眼科学会総会. 2008. 4. 東京

3. 蕪城俊克: 「後眼部疾患」 ぶどう膜炎診療の進歩 日本におけるぶどう膜炎の動向. 第 112 回日本眼科学会総会. 2008. 4. 東京

4. 蕪城俊克: ぶどう膜炎 新しい病態理解とその治療法. 第 112 回日本眼科学会総会. 2008. 4. 東京

5. 沖永貴美子, 蕪城 俊克, 高本光子, 荒木章之, 藤野雄次郎, 沼賀二郎, 川島秀俊: 免疫健全者にみられたクリプトコッカス眼内炎の 1 症例. 第 42 回日本眼炎症学会. 2008. 7. 博多

6. 高本 光子, 蕪城 俊克, 玉島 順子, 沖永 貴美子, 藤村 茂人, 川島 秀俊, 沼賀 二郎, 藤野 雄次郎: 東大眼科で近年経験したサイトメガロウイルス網膜炎の検討. 第 62 回日本臨床眼科学会総会. 2008. 10. 東京.

7. 蕪城俊克: TNF α 標的療法 現状と今後の展望. シンポジウム「眼感染症・炎症性疾患に対する新しい治療.」第 62 回日本臨床眼科学会総会. 2008. 10. 東京.

H. 知的財産権の出願、登録状況

特許取得

なし

実用新案登録

なし

その他

なし