

1. 太田正穂、水木信久：遺伝と目の異常。
からだの科学、2009； 263:32-38
2. Ota M, Asamura H, Oki T, Sada M.
Restriction enzyme analysis of PCR
products. Methods Mol Biol. 2009;
578:405-14
3. Nakamura J, Meguro A, Ota M,
Nomura E, Nishide T, 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 receptor2
gene polymorphisms with normal
tension glaucoma. Mol Vis. 2009; 15:
2905-10.
4. Asukata Y, Ota M, Meguro A,
Katsuyama Y, Ishihara M, Namba K,
Kitaichi N, Morimoto S, Kaburaki T,
Ando Y, Takenaka S, Inoko H, Ohno
S, Mizuki N. Lack of association
between toll-like receptor 4 gene
polymorphisms and sarcoidosis-
related uveitis in Japan. Mol Vis.
2009; 15: 2673-82.
5. Meguro A, Inoko H, Ota M, Katsuyama
Y, Oka A, Okada E, Yamakawa R,
Yuasa T, Fujioka T, Ohno S, Bahram
S, Mizuki N. Genetics of Behcet's
disease inside and outside the MHC.
Ann Rheum Dis. 2009 in press.
6. 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 glaucoma in the Japanese
population. Clin Ophthalmol. 2009; 3:
307-312.
7. 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. Clin
Ophthalmol. 2009; 3:183-188.
8. Horie Y, Kitaichi N, Katsuyama Y,
Yoshida K, Miura T, Ota M, Asukata
Y, Inoko H, Mizuki N, Ishida S,
Ohno S. Evaluation of PTPN22
polymorphisms and Vogt-Koyanagi-
Harada disease in Japanese patients.
Mol Vis. 15:1115-1119, 2009.
9. Horie Y, Meguro A, Ota M, Kitaichi
N, Katsuyama Y, Takemoto Y,
Namba K, Yoshida K, Song YW,
Park KS, Lee EB, Inoko H, Mizuki
N, Ohno S. Association of TLR4
polymorphisms with Behcet's disease
in a Korean population. Rheumatology
48:638-642, 2009

10. 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. 2009; 23:222-229.

11. Tomiyama R, Meguro A, Ota M, Katsuyama Y, Nishide T, Uemoto R, Iijima Y, Ohno S, Inoko H, Mizuki N. Investigation of the association between Toll-like receptor 2 gene polymorphisms and Behçet's disease in Japanese patients. Hum Immunol. 2009; 70:41-44.

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

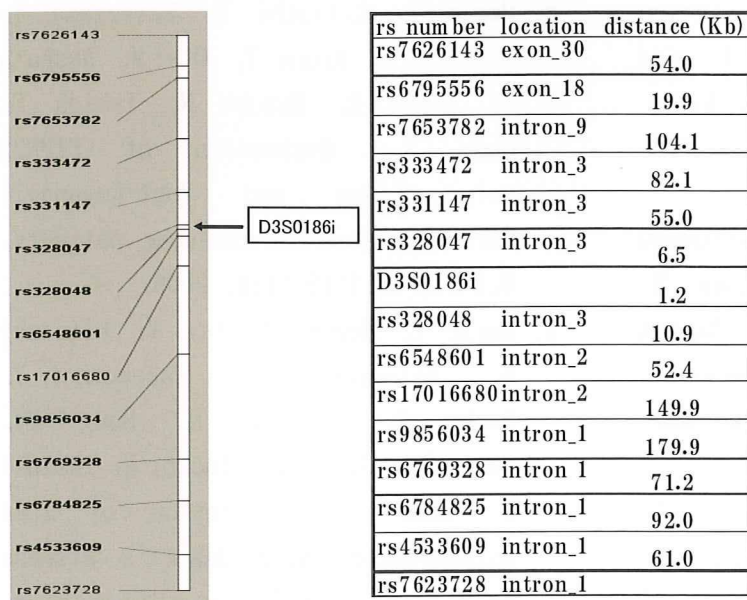


表1 *ROBO1*遺伝子内SNPsとの相関 (韓国人)

SNP rs	Allele	Patient n=117 (%)	Control n=139 (%)	R.R.	p
rs7626143	G	82(70.1)	96(69.1)	1.05	0.86
	T	88(75.2)	115(82.7)	0.63	0.14
rs6795556	G	109(93.2)	127(91.4)	1.29	0.59
	T	54(46.2)	73(52.5)	0.77	0.31
rs7653782	C	74(63.2)	124(89.2)	1.65	0.27
	T	92(78.6)	73(52.5)	0.75	0.25
rs333472	C	92(78.6)	90(64.7)	2.00	0.01
	T	78(66.7)	109(78.4)	0.55	0.03
rs331147	G	83(70.9)	96(69.1)	1.09	0.74
	T	84(71.8)	117(84.2)	0.48	0.02
rs328047	A	110(94.0)	131(94.2)	0.96	0.94
	G	48(41.0)	64(46.0)	0.82	0.42
D3S0186i					
rs328048	C	102(87.2)	123(88.5)	0.88	0.75
	G	59(50.4)	73(52.5)	0.92	0.74
rs6548601	A	110(94.0)	131(94.2)	0.96	0.94
	G	48(41.0)	62(44.6)	0.86	0.56
rs17016680	A	93(79.5)	120(86.3)	0.61	0.14
	G	81(69.2)	86(61.9)	1.39	0.22
rs9856034	A	70(59.8)	88(63.3)	0.86	0.57
	G	101(90.6)	120(86.3)	1.00	1.00
rs6769328	A	87(74.4)	126(90.6)	0.99	0.99
	G	76(38.0)	72(51.8)	1.16	0.55
rs6784825	C	87(74.4)	98(70.5)	1.21	0.49
	T	86(73.5)	117(84.2)	0.52	0.04
rs4533609	C	113(96.6)	131(94.2)	1.73	0.38
	T	35(29.9)	48(34.5)	0.81	0.43
rs7623728	C	74(63.2)	124(89.2)	1.65	0.27
	T	92(78.6)	73(52.5)	0.75	0.25

表2 *ROBO1*遺伝子内SNPsとの相関 (トルコ人)

SNP rs	Allele	Patient n=35 (%)	Control n=72 (%)	R.R.	p
rs7626143	G	14(40.0)	19(26.4)	1.86	0.15
	T	35(100)	67(93.1)	5.79	0.11
rs6795556	G	34(97.1)	65(90.3)	3.66	0.21
	T	15(42.9)	32(44.4)	0.94	0.88
rs7653782	C	34(97.1)	67(93.1)	1.87	0.39
	T	13(37.1)	26(36.1)	1.05	0.92
rs333472	C	17(48.6)	39(54.2)	0.80	0.59
	T	32(91.4)	65(90.3)	1.15	0.85
rs331147	G	13(37.1)	31(43.1)	0.78	0.56
	T	32(91.4)	70(97.2)	0.30	0.18
rs328047	A	32(91.4)	60(83.3)	2.13	0.26
	G	12(34.3)	36(50.0)	0.52	0.13
D3S0186i					
rs328048	C	23(65.7)	54(75.0)	0.64	0.32
	G	30(85.7)	56(77.8)	1.71	0.33
rs6548601	A	32(91.4)	63(87.5)	1.52	0.55
	G	17(48.6)	41(56.9)	0.71	0.41
rs17016680	A	35(100)	71(98.6)	1.49	0.48
	G	8(22.9)	16(22.2)	1.04	0.94
rs9856034	A	26(74.3)	40(55.6)	2.31	0.06
	G	32(91.4)	59(81.9)	2.35	0.20
rs6769328	A	28(80.0)	58(80.6)	0.97	0.95
	G	24(68.6)	47(65.3)	1.16	0.74
rs6784825	C	25(71.4)	50(69.4)	1.10	0.83
	T	29(82.9)	58(80.6)	1.17	0.77
rs4533609	C	35(100)	71(98.6)	1.49	0.48
	T	0(0.00)	10(13.9)	0.08	0.02
rs7623728	C	25(71.4)	53(73.6)	0.90	0.81
	T	35(100)	51(70.8)	29.64	0.00037

厚生労働科学研究補助金

ベーチェット病の診断における自家唾液プリックテストの解析および IL-7R α 遺伝子多型解析

分担研究者 中村晃一郎：埼玉医科大学皮膚科

協力研究者 金子史男：脳神経疾患研究所附属皮膚免疫・アレルギー疾患研究所
目黒明、水木信久：横浜市立大学眼科

研究要旨

ベーチェット病（B病）は、原因不明の炎症性疾患であり、針反応の亢進など皮膚の過敏性反応を認める。B病の病態には口腔内常在菌である *staphylococcus sanguinis* の関与が報告されており、この菌体成分を用いた皮内テストでB病で膿疱が形成されることが認められている。そこで自家唾液を用いたプリックテストの反応性に関してB病と他疾患で比較検討した。B患者7名中5名で紅斑・膿疱の出現を認めた。口腔内アフタ、結節性紅斑では顕著な膿疱の出現を認めなかった。この結果は、自己唾液を用いたプリックテストは、B病と他疾患の鑑別に有用である可能性が示唆された。またT細胞の増殖因子であるサイトカインであるIL-7の受容体（IL-7R α ）遺伝子多型（-1085, -449）頻度に関してBD病と健常人で解析した。IL-7R α 遺伝子多型（-449）genotype頻度に関して、眼症状の有無で両群間で頻度の差を認め、IL-7R α 遺伝子多型頻度からみて病態に関与する可能性が示された。

A. 研究目的

①ベーチェット病（BD）は、口腔内潰瘍、陰部潰瘍、ブドウ膜炎に、結節性紅斑、毛嚢炎、針反応亢進などの皮膚症状を呈する。本症の発症は、口腔内潰瘍で出現することが多いが、本症の口腔内常在菌として、*streptococcus sanguinis* をはじめとする溶連菌、グラム陰性菌が報告されている。これまで、溶連菌やブドウ球菌などでB患者に皮内テストを施行すると顕著な紅斑、膿疱を生じることから、常在菌である溶連菌などに対する過敏反応がB病に生じると考えられる。すなわちB病では針反応に対する過敏反応があり、さらに上記の常在菌に対する過敏反応を示すと考えられる。このような皮膚の過敏反応はB病の早期の診断にきわめて有用であると考えられる。そこでこれらの自家唾液を用いて早期診断に有意義であるかを試みた。

②B病の病態はTh1細胞によるIFN- γ 産生異常などの獲得免疫異常、また自然免疫異常がある。IL-7はT細胞の増殖因子でありこれまでIL-7受容体（IL-7R α ）遺伝子多型頻度が、多発性硬化症、若年性関節リウマチなどの免疫異常を生じる疾患で変化することが報告されている。B病に関してはTNF- α 、TLR4遺伝子多型頻度の関与が指摘されている。

B. 研究方法

①B病（神経B病、不全型、完全型）、および再発性口内炎、結節性紅斑、健常人で、自家唾液を用いてプリックテストを施行し、48時間後に紅斑、膿疱の有無について検討した。B病の早期診断に有意義であるかを解析した。
②IL-7R α 遺伝子多型解析を試みた。

C. 研究結果

①B病患者（7名）で自家唾液を用いたプリックテストを施行した。5名で直径5～10mmの紅斑、小膿疱の形成を認めた。いっぽう一般の結節性紅斑、再発性口内炎では、顕著な反応は認めなかった。また健常人では紅斑は認めなかった。

②B病と健常人で、IL-7R α (-1085)genotype頻度、allele頻度で有意差は認めなかった。

B病と健常人で、IL-7R α (-449領域)のGG genotype頻度で有意な頻度の低下を認めた。完全型、不全型B病患者、またHLA-B51保有群・非保有群で、IL-7R α (-1085, -449) genotype・allele多型頻度で有意差は認めなかった。眼症状保有群・非保有群間で、IL-7R α (-1085)領域のgenotype多型頻度に有意差を認めた。皮膚症状、関節症状、HLA-A2601保有群・非保有群間で IL-7R α (-1085, -449)多型頻度に有意差を認めなかった。

D. 結論

以上の結果から、B病の自家唾液を用いたプリックテストは、早期診断に有用である可能性が示された。血管型や神経型などの特殊型では、一般に眼症状を有することは少なく、したがって早期の確定診断が求められる。このような症例では皮膚症状の有無が重要であり、早期に菌体成分に対する過敏反応を見出すことが重要である。このことから、皮膚の過敏反応を自己唾液検査を用いて見つけることができれば、有用と考えられる。また遺伝子多型解析ではIL-7R α 遺伝子多型のB病の病態における関与が示された。

E. 参考文献

1. Mizushima Y, Matsuda T, Hoshi K, Ohno S: Induction of Behcet's disease symptoms after dental treatment and streptococcal antigen skin test. J

Rheumatol 15:1029-1030, 1988

2. Mizuki N, Ota M, Kimura M, et al.: Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: a strong association of six GCT repetitions with Behcet's disease, Proc Natl Acad Sci USA 58: 181-184, 1997

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: 1534-1540, 2006

3. 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

F. 健康危機情報：なし

G. 研究発表

1. 論文発表

①中村晃一郎。ベーチェット病。p970, 今日の治療指針2010、医学書院。

②金子史男、斎藤早苗、富樫亜吏、尾山徳孝、中村晃一郎。ベーチェット病の自家反応。日本皮膚学会雑誌、印刷中。

2. 学会発表

①Nakamura Koichiro, Tetsuya Tsuchida, Akira Meguro, Nobuhisa Mizuki. Analysis of interleukin-7 receptor - α gene single polymorphism in Behcet disease. p237,

The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2009.

H.知的財産権の出願、登録状況

- ①：なし
- ②実用新案登録：なし
- ③その他：なし

Prick test with self-saliva in BD patients and controls

	Erythema reaction (after 48 h)	small pustule	pathergic reaction (saline)
BD patients			
Neuro BD 55 M	11x15mm	+	-
Incomplete 26 F	10x10	+	-
27 M	11x 12	+	-
47 M	10x 13	+	-
36 F	5x10	-	-
46 M	2x 2	-	-
Complete 23 M	10x10	+	-
Recurrent aphthosis			
24 F	8x10mm	-	-
28 F	3x4	-	-
32 F	-	-	-
Disease controls			
non BD EN 39 F	-	-	-
viral aphthosis 33F	-	-	-
Healthy controls (5)	-	-	-

BD: Behcet's disease, EN: erythema nodosum, F: female, M: male
The clinical type of BD is followed by the Japanese BD classification.

IL-7R α (-1085) SNP Frequencies with Cutaneous Signs, Arthropathies, Ophthalmic Signs and HLA-A2601

Genotype	Frequencies		Positivity	
	-1085	Positivity	-1085	Positivity
	Skin Involvement n=16	Skin Un-Involvement n=11	Arthropathies Involvement n=13	Arthropathies Un-Involvement n=14
T/T	12	9	11	10
G/T	4	2	2	4
G/G	0	0	0	0
	Ocular Involvement n=22	Ocular Un-Involvement n=5	Positive HLA-A2601 n=7	Negative HLA-A2601 n=20
T/T	16*	5*	6	15
G/T	6	0	1	5
G/G	0	0	0	0

(* ocular positive groups v.s. ocular negative groups: P<0.001)

IL-7R α (-449) SNP Frequencies with Cutaneous Signs, Arthropathies, Ophthalmic Signs and HLA-A2601

Genotype	Frequencies		Positivity	
	-449	Positivity	-449	Positivity
	Skin Involvement n=16	Skin Un-Involvement n=11	Arthropathies Involvement n=13	Arthropathies Un-Involvement n=14
A/A	8	3	5	6
A/G	8	8	8	8
G/G	0	0	0	0
	Ocular Involvement n=22	Ocular Un-Involvement n=5	Positive HLA-A2601 n=7	Negative HLA-A2601 n=20
A/A	9	2	3	8
A/G	13	3	4	12
G/G	0	0	0	0

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

ベーチェット病におけるインフラマソーム

研究代表者 石ヶ坪良明(横浜市立大学病態免疫制御内科)
共同研究者 寒川整(横浜市立大学病態免疫制御内科)
桐野洋平(横浜市立大学病態免疫制御内科)
上田敦久(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)
Kastner DL(Genetics and Genomics Section NIH/NIAMS)
Remmers E(Genetics and Genomics Section NIH/NIAMS)

研究要旨

Autoinflammatory syndromeの代表的疾患である家族性地中海熱は好発地域やコルヒチンが治療薬として用いられるなどの点でベーチェット病との共通点がある。また同疾患の原因遺伝子であるMEFV遺伝子はベーチェット病の血管病変や有病率との関連性が報告されている。

本研究ではMEFV遺伝子産物であるpyrinの機能解析、コルヒチンの作用機序を解析することによりベーチェット病の病因を解明することを目的としている。pyrinの機能解析としてpyrinと結合するタンパクのスクリーニングを行い、複数の候補タンパクを得た。その中でもS100A9タンパクはコルヒチンで分泌が抑制されることがわかっている。今後はこれら候補タンパクの炎症性疾患における役割を解析していき、ベーチェット病との関連性を調査する予定である。

またNIHと共同で日本人、トルコ人のベーチェット病患者及び健常人の検体を用いてインフラマソーム関連遺伝子とベーチェット病の関連を解析している。

A. 研究目的

Autoinflammatory syndromeは口腔内アフタや陰部潰瘍、ぶどう膜炎などベーチェット病に類似した臨床像を呈することが知られており、炎症に関与するタンパク複合体であるinflammasomeの機能異常が病因として考えられている。Autoinflammatory syndromeの代表的な疾患である家族性地中海熱はMEFV遺伝子の変異が原因とされており、このMEFV遺伝子の変異は家族性地中海熱

の発症に関わるだけでなく、ベーチェット病の有病率やベーチェット病における血管病変との関連性が報告されている。さらに家族性地中海熱では90%近い症例でコルヒチンが有効である。これらの共通点からベーチェット病と家族性地中海熱には何らかの共通した病因が存在している可能性がある。

本研究は以上の事項を踏まえ、家族性地中海熱の発症機序やコルヒチンの作用機序を解

明することで、ベーチェット病の病因を解析することを目的としている。

B. 研究方法

1. Pyrinの機能解析とコルヒチンの作用機序

Yeast two-hybrid法によりpyrinと結合する新規タンパクのスクリーニングを行った。

酵母はAH109株を、転写因子にはGAL4を用いた。Baitにpyrin、preyにはヒト骨髄cDNAライブラリー及びヒト白血球cDNAライブラリーを用いた。

今回は特異性を高めるためGAL4のレポーター遺伝子であるHIS3、ADE2、MEL1すべてを発現している酵母を陽性クローンとした。

2. インフラマソーム関連遺伝子の変異解析

国際ベーチェット病診断基準を満たした日本人BD患者 (n=370) および健常人 (n=396) とトルコ人BD患者 (n=1175) および健常人 (n=1268) の検体を用いて、MEFVの代表的な変異・多型であるE148QとM694V/Iを調べた。

また当施設において不明熱やベーチェット病の症状を呈する患者のMEFV遺伝子変異についても解析を行っている。

C. 研究結果

1. Pyrinの機能解析とコルヒチンの作用機序

上記手法により計258の陽性クローンを得た。このうち94クローンからpreyベクターを抽出し、組み込まれているcDNA配列を解析した。

その結果すでにpyrinとの結合が実験的に証明されているASC、pyrin、actinをはじめ計60種のタンパクを同定した (別表1、2参照)。

2. インフラマソーム関連遺伝子の変異解析

MEFV遺伝子exon2にあるE148Q多型は日本人のベーチェット病患者に多い傾向を認め

たが、トルコ人では有意差を認めなかった。またexon10に認められるM694V変異に関してはトルコ人のベーチェット病患者での保有率が有意に高かった (表3参照)。

D. 考察

今回同定されたタンパクの中でもS100A9は好中球・単球に発現し、細胞内シグナルとしての機能とサイトカインとしての機能の両者を有している。サイトカインとしては好中球の遊走に関与し、またToll-like receptor 4のリガンドとしても機能する。このS100A9の細胞外への分泌はコルヒチンによって阻害されることが明らかになっている。これらのことからS100A9は何らかの形でベーチェット病の病態に関与している可能性がある。またその他にもT細胞の機能に関与するgalectinや以前からベーチェット病との関連が報告されているheat shock protein40も今回同定されている。今後はこれらのタンパクが実際に哺乳細胞内でpyrinと結合しているか、また家族性地中海熱で認められるpyrinの変異がこれらタンパクとの結合にどのような影響を与えるかなどを検討していく。

またベーチェット病との関連性が強く示唆されるタンパクに関してはベーチェット病患者における同タンパクをコードする遺伝子多型、血清中の同タンパクの濃度を健常人をコントロールとして解析していく予定である。

MEFV遺伝子解析では日本人ベーチェット病患者でE148Q多型の保有率が高かった。このE148Q多型は炎症性腸疾患などの他炎症性疾患でも病型との関連性が報告されている。このことからE148Q多型は日本人に認められるベーチェット病の臨床傾向に寄与している可能性がある。M694V変異はトルコ人で有意差を認めたが、トルコ人では家族性地中海熱とベーチェット病の合併例も認められるこ

とから臨床像も考慮した解析が必要と考えられる。

E. 結論

今回我々は家族性地中海熱の原因タンパクであるpyrinと結合しうる候補タンパクを得ることができた。中でもS100A9はベーチェット病の病因と関連している可能性がある。これらの候補タンパクに関し、pyrinとの結合性やベーチェット病との確認などさらなる解析が必要である。

またMEFV遺伝子解析についても日本人におけるE148Q多型とベーチェット病有病率との関連性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

著書

石ヶ坪良明：今日の治療指針 膠原病に伴う肺病変 700-701, 2010年度版

学術論文

Ideguchi H, Suda A, Takeno M, Kirino Y, Ihata A, Ueda A, Ohno S, Baba Y, Kuroiwa Y, Ishigatsubo Y. Neurological manifestations of Behcet's disease in Japan: a study of 54 patients. J. Neurol. In press.

英文原著

和文総説

4. 岳野光洋、石ヶ坪良明：疾患と対応 膠原病Behcet病（特殊型）、腸管型）内科：103巻6号1482-1487, 2009.
5. 石ヶ坪良明：ベーチェット病と遺伝（Q

&A) 日本医事新報4438号82-83, 2009.

6. 石ヶ坪良明：Behcet病Up-To-Date 日本内科学会雑誌 98巻3号583-588, 2009.

2. 学会発表

国際学会

1. Suda A, Ideguchi H, Takeno M, Ohno S and Ishigatsubo Y. Immunosuppressant Related Neurological Involvement in Behcet's Disease. 75th American College of Rheumatology, Philadelphia, USA, 2009. Oct
2. Suda A, Ideguchi H, Takeno M, Ono S, Ihata A, Ueda A and Ishigatsubo Y. MRI Imaging Findings in Neuro-Behcet Disease. 75th American College of Rheumatology, Philadelphia, USA, 2009. Oct
3. Uehara T, Takeno M, Samukawa S, Hama M, Ohmura K, Suda A, Ihata A, Ueda A and Ishigatsubo Y. Infliximab Therapy Significantly Suppresses Ocular Inflammation in Behcet's Disease. 75th American College of Rheumatology, Philadelphia, USA, 2009. Oct
4. Ishigatsubo Y Experience with anti-TNF Agents in Behcet's Disease. American College of Rheumatology 74th ACR, Philadelphia, USA, 2009. Oct
5. Ishigatsubo Y. Genetics of Behcet's disease. Korean Japan Joint Symposium. Korean Japan Joint Symposium. Seoul, 2010. Nov.

国内学会

5. 上原武晃、岳野光洋、寒川整、浜真麻、桐野洋平、須田昭子、井畑淳、上田敦久、石ヶ坪良明。ベーチェット病ぶどう膜炎

に対するインフリキシマブ治療 第53回
日本リウマチ学会総会2009年4月 東京

6. 岩花清佳、角田慎一郎、宮城瑠美子、
小張真吾、長岡章平、石ヶ坪良明 難治
性腸管Behcet病にInfliximabが奏功し
た1例 第53回日本リウマチ学会総会200
9年4月 東京
7. 須田昭子(横浜市立大学 医学部病態免疫
制御内科学), 出口治子, 岳野光洋, 寒川
整, 浜真麻, 桐野洋平, 井畑惇、上田敦
久、石ヶ坪良明 ベーチェット病 神経
ベーチェット病(N BD)発症の危険因子
の解析 第53回日本リウマチ学会総会20
09年4月 東京
8. 出口治子(横浜市立大学附属市民総合医
療センター リウマチ膠原病センター),
須田昭子, 岳野光洋, 高瀬薫、大野滋,
桐野洋平, 井畑惇, 上田敦久, 石ヶ坪良
明 ベーチェット病 ベーチェット病患
者412名の臨床的特徴 第53回日本リウ
マチ学会総会2009年4月 東京

和文著書

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし

表 1 yeast two-hybrid 法により得たタンパク

Parkinson disease (autosomal recessive, early onset) 7	actin, beta
G0/G1switch 2	carbohydrate (chondroitin 4) sulfotransferase 11
RA P1B, member of RAS oncogene family	ferritin, heavy polypeptide 1
zinc finger protein 302	PYD and CARD domain containing
lectin, galactoside-binding, soluble 1	replication protein A2, 32kDa
translocase of outer mitochondrial membrane homolog40	guanylate kinase 1
phosphoinositide--kinase, regulatory subunit	eukaryotic translation initiation factor 3
septin	menage a trois log 1, cyclin H assembly factor
chaperonin containing TCP	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
MAM domain containing glycosylphosphatidylinositol anchor	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1
ribonuclease H	ornithine decarboxylase antizyme 1
MIT, microtubule interacting and transport, domain containing 1	Vimentin
nuclear fragile X mental retardation protein interacting protein 2	ATG2 autophagy related 2 log A
major histocompatibility complex, class I, C	RAB3 GTPase activating protein subunit 1
leucine rich repeat and Ig domain containing 3	ATPase, Na+/K+ transporting, beta 3 polypeptide
proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 9	flotillin 2
DnaJ (Hsp40) log, subfamily B, member 1	cytochrome b-245, alpha polypeptide
thymidine phosphorylase	Fas (TNFRSF6) associated factor 1
ubiquitin specific peptidase 12	cytochrome c oxidase subunit Va
guanylate kinase 1	KIAA0100
WW domain binding protein 2	polymerase (RNA) I polypeptide C, 30kDa
neuron derived neurotrophic factor	ATG16 autophagy related 16-like 2
enolase 1	chromosome 11 open reading frame 17
zinc finger protein 36, C3H type, log	NODAL modulator 3
RNA binding motif protein 25	UPF1 regulator of nonsense transcripts homolog
aldolase A, fructose-bisphosphate	S100A9
tumor protein, translationally-controlled 1	PRP8 pre-processing factor 8 log
ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 4	myosin, heavy chain 9, non-muscle
protein phosphatase 2, regulatory subunit B, gamma isoform	Mediterranean fever
filamin A, alpha	metallothionein 2A

表 2 複数のクローンを得たタンパク

vimentin (VIM)	2
G0/G1switch 2 (G0S2)	5
ferritin, heavy polypeptide 1 (FTH1)	3
eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 (EEF1A1)	9
chaperonin containing TCP1, subunit 7 (eta) (CCT7)	3
PYD and CARD domain containing (PYCARD)	2
lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (LGALS1)	2
ribonuclease H (RNASEH)	2
actin, beta (ACTB)	3
tumor protein, translationally-controlled 1 (TPT1),	2
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	2
S100A9	6
guanylate kinase 1 (GUK1)	2

表3 MEFV遺伝子解析結果
E148Q

Series	Diagnosis	Subject <i>n</i>	C	G	MAF%	OR (95% CI)	<i>P</i> value
Turkish	BD	1175	123	2227	5.2	1.04 (0.48-0.82)	0.72
	Control	1268	127	2409	5.0		
Japanese	BD	370	180	560	24.3	1.27 (0.44-0.90)	0.045
	Control	396	159	633	20.1		
Combined	BD	1545	303	2787		1.16 (0.98-1.39)	0.045
	Control	1664	286	3042			

M694V

Series	Diagnosis	Subject <i>n</i>	CC	CG	GG	MAF%	OR (95% CI)	<i>P</i> value
Turkish	BD	1167	4	101	1062	4.7	2.72 (1.89-3.93)	<i>3.1x10⁻⁹</i>
	Control	1274	0	43	1231	1.7		

M694I ヘテロ

日本人 BD n=2, HC n=1

表4 当施設における MEFV 遺伝子解析 (2009年12月時点)

	健常人	SLE	FMF患者	FMF家族
E148Q/-	12	9	0	0
E148Q/E148Q	1	0	0	0
L110P/- E148Q/-	1	0	0	0
L110P/-	0	1	0	0
L110P-E148Q/E148Q	0	0	0	1
L110P-E148Q/M694I	0	0	0	1
E148Q/- M694I/-	0	0	0	1
M694I/-	0	0	1	1
M694I/M694I	0	0	2	0
L110P/L110P E148Q/E148Q M694I/-	0	0	1	0
L110P/- E148Q/E148Q M694I/-	0	0	1	0
その他	0	2	0	0
変異なし	12	7	0	0
合計	26	19	5	4
E148Q保有率	50.0%	47.4%	40.0%	75.0%

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

ベーチェット病病変部へのTh17前駆細胞の浸潤に
MIP-3 α -CCR6 axisが関与している

研究分担者 桑名 正隆 慶應義塾大学医学部内科学教室
安岡 秀剛 慶應義塾大学医学部内科学教室
陳 竹 慶應義塾大学医学部内科学教室
竹内 勤 慶應義塾大学医学部内科学教室

研究要旨

昨年度我々はベーチェット病病変部に浸潤するIL-17産生T細胞の病態への関与を報告した。そこで本年はTh17の前駆細胞の一つであるCD4⁺CCR6⁺細胞に着目し、これらの細胞の病変部への浸潤の機序を明らかにすることを目的とした。BD 27例と健常人13例を対象として、CCR6のリガンドである血漿MIP-3 α 濃度はELISAで、また末梢血中CD4⁺T細胞上のCCR6発現は蛍光標識抗体を用いたフローサイトメトリーで解析した。血漿中のMIP-3 α 濃度は健常人と比較し、ベーチェット病で高値であった。活動期・非活動期に経過を観察しえた4例で血漿MIP-3 α 濃度を比較したが、疾患活動性とは無関係であった。CD4⁺T細胞中のCCR6⁺細胞の比率は活動期で低値であり、病変部へのリクルートが示唆された。興味深いことに、疾患活動期にはCCR6高発現のCD4⁺細胞の比率が減少していた。これらの結果より、BD病変部では恒常的にMIP-3 α が高く、疾患活動期にはCD4⁺CCR6⁺T細胞が浸潤することで、病変形成に関与する可能性が示唆された。

A. 研究目的

ベーチェット病は原因不明の炎症性疾患であるが、病変部組織では好中球およびリンパ球の浸潤がみられる (1, 2)。これまでベーチェット病においてリンパ球に関するさまざまな検討が行われてきた。近年、CD4⁺T細胞はTh1/Th2サブセット以外にIL-17産生を特徴とするTh17と呼ばれる新たなサブセットが報告され(3)、注目されているが、昨年度我々はベーチェット病においてIL-17産生T細胞が関連する疾患サブセットが存在し、CD4⁺T細胞や γ δ T細胞がそのソースの一つである可能性を示した。しかしIL-17産生T細胞がその病態に関与するためにはこれらの

細胞が病変部へ浸潤する必要がある。そこで本年度はTh17の病変部への浸潤の機序を追究することを目的とした。Th17前駆細胞の多くはCD4⁺CCR6⁺T細胞で、細胞遊走に関与するケモカインレセプターの発現に規定される (4)。CCR6はリンパ球が皮膚や粘膜にhomingする際に必要なレセプターであるが (5)、皮膚や粘膜はベーチェット病の病変分布と共通である。一方でCCR6のリガンドはMIP-3 α /CCL20であり、一対一対応である点が特徴的である (6)。さらに最近の報告ではベーチェット病皮膚組織ではMIP-3 α の発現が亢進し、CCR6⁺細胞が浸潤していることも示されている(7)。今年度我々はこの細

胞分画に着目し、ベーチェット病患者末梢血リンパ球で検討した。

B. 研究方法

1. 対象

対象は厚生労働省ベーチェット病診断基準を満たすベーチェット病27例（活動期12例、非活動期15例、男女比 4 : 5、平均年齢 45.1 ± 10.9 歳、HLA-B51陽性例 63 %、完全型14例、眼病変を有する症例 22例）、健常人13例（平均年齢 39.5 ± 8.6 歳、男女比 6 : 7）をコントロールとして用いた。

2. 血漿MIP-3 α 濃度の測定

ヘパリン採血により得られた全血より比重遠心法を用いて末梢血単核細胞（PBMC）と血漿を分離した。分離した血漿は更なる遠心により血小板を除去した。血漿中のMIP-3 α 濃度はQuantikine[®]（R&D systems）enzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）を用いて測定した。

3. CD4⁺CCR6⁺T細胞の検出

CD4およびCCR6の発現はそれぞれの分子に対する蛍光標識抗体と反応させた後、FACS Caribur（Becton Dickinson）を用いたフローサイトメトリーにより解析した。

4. 統計学的解析

二群間の比較はMann-Whitney U-testで検討し、 $p < 0.05$ を有意とした。

（倫理面への配慮）

すべての症例で本研究に関する説明を行い、文書によるインフォームドコンセントを取得した。

C. 研究結果

まず、Th17前駆細胞がその表面マーカーの一つであるCCR6を介してベーチェット病病変部局所にリクルートされる可能性を検討した。そのためCCR6のリガンドであるMIP-

3 α の血漿での濃度を、ベーチェット病27例および健常人13例を用いて検討した。その結果、血漿MIP-3 α 濃度は、健常人と比較し、ベーチェット病患者で高値であった（40 ± 54 pg/ml vs 14 ± 8 pg/ml, $p = 0.03$ ）。特にMIP-3 α 濃度が50 pg/ml以上の4例に共通する臨床特徴はみられなかった。

眼発作に対しステロイドや免疫抑制薬による治療を行い、軽快後も追跡し得た完全型ベーチェット4例について血漿MIP-3 α 濃度の変化を検討したが、MIP-3 α 濃度の変化は疾患活動性と明らかな相関を認めなかった。

さらに、眼症状の活動期および軽快時に経過を観察し採血しえた完全型ベーチェット3例で、末梢血CD4⁺T細胞中のCCR6⁺細胞の比率の変化についてフローサイトメトリーを用いて検討した。症状出現時では軽快時に比較し、CD4⁺T細胞中のCCR6⁺細胞の比率は3例とも低値であった（図1）。また、CCR6の発現レベルをヒストグラムでみると、その発現レベルは2峰化しており、CCR6^{high}とCCR6^{low}の分画に層別化が可能であった。3例全例において、活動期にはCD4⁺CCR6⁺細胞中のCCR6^{high}分画は非活動期に比較して低値であった（38.6 ± 11.1 % vs 60.1 ± 5.8 %）。以上の結果より、活動期にはCCR6^{high}分画が病変部にリクルートされている可能性を示唆した。

D. 考察

昨年度我々はベーチェット病ではIL-17産生T細胞が病態に関連する疾患サブセットが存在し、CD4⁺T細胞や $\gamma\delta$ T細胞がIL-17のソースの一つとなりうる可能性を示した。

IL-17は慢性炎症や炎症性細胞の遊走に関わるのみならず（8）、臨床的にもぶどう膜炎（9）や中枢神経の炎症（10）と関連することが報告されていることから、IL-17産生T細

胞がベーチェット病における病変形成に関与する可能性がある。しかし、そのためにはこれらT細胞が末梢にリクルートされることが必要である。そこで、今年度はTh17の大部分に発現しているケモカインレセプターCCR6 (4) に着目し、末梢血CD4⁺T細胞におけるレセプターの発現やそのリガンドであるMIP-3 α の血漿中の濃度について検討し、Th17がCCR6-MIP-3 α axisを介して末梢にリクルートされ、ベーチェット病の病変形成に関与する可能性を検討した。その結果、ベーチェット病患者の末梢血中MIP-3 α 濃度は、健常人と比較し、高値であった。これは病変部局所で、MIP-3 α が産生されることにより、病変部局所での濃度が上昇し、流血中へ拡散している可能性を示唆する。この結果はベーチェット病病変部皮膚組織でMIP-3 α が高発現しているとする報告 (7) と一致する。また末梢血中におけるCD4⁺細胞中のCCR6⁺細胞の比率は、病変の活動期に減少し、非活動期にその比率が増加していたことから、これらの細胞群が末梢にリクルートされる可能性が考えられた。さらに興味深いことにCD4⁺CCR6⁺細胞中のCCR6^{high}の分画の比率がベーチェット病活動期に低下していたことから、CCR6発現の高い細胞が特に末梢にリクルートされる可能性が考えられた。

CCR6はこれまでリンパ球の皮膚や粘膜へのhomingに関与していることが報告されており、ベーチェット病の病変部と一致している。また一般的にケモカインとケモカインレセプターは一般的に多対多の関係にあり、互いの特異性はあまり高くない。しかし、CCR6はMIP3 α のみが対応するリガンドで、珍しく一対一の関係にある (6)。この事実はこの系を介して浸潤する細胞はある特定の細胞集団がenrichされた形で病変に浸潤する可能性があることを示唆し、これらがベーチェッ

ト病の病変形成に重要な役割を果たす可能性が考えられる。

しかし、CCR6の発現レベルと細胞の遊走能の関係についてはいまだ明らかな報告がない。また、Th17はあくまでCD4⁺CCR6⁺細胞の一部に過ぎず、CD4⁺CCR6⁺T細胞がその他のエフェクターを含み、それらがベーチェット病の病態と関連する可能性も考えられる。さらに、これらの現象がベーチェット病に特異的かは示されていない。今後、対照疾患を含む多数例での検討や、組織を用いた検討が必要と考えられた。

S. 結論

ベーチェット病ではTh17の前駆細胞であるCD4⁺CCR6⁺T細胞が病変部に浸潤し、病態形成に関与する可能性が示唆された。

(文献)

- 1) Sakane T, Takeno M, Suzuki N, Inaba G. Behçet's disease. *N Engl J Med.* 1999; 341(17): 1284-1291.
- 2) Emmi L, Brugnolo F, Salvati G, Marchione T. Immunopathological aspects of Behçet's disease. *Clin Exp Rheumatol.* 1995; 13(6): 687-691.
- 3) Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol.* 2007; 25: 821-852.
- 4) Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A, Sallusto F, Napolitani G. Surface phenotype and antigenic

- specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol.* 2007; 8(6): 639-646.
- 5) Liao F, Rabin RL, Smith CS, Sharma G, Nutman TB, Farber JM. CC-chemokine receptor 6 is expressed on diverse memory subsets of T cells and determines responsiveness to macrophage inflammatory protein 3 alpha. *J Immunol.* 1999; 162(1): 186-194.
- 6) Williams IR. Chemokine receptors and leukocyte trafficking in the mucosal immune system. *Immunol Res.* 2004; 29(1-3): 283-292.
- 7) Keller M, Spanou Z, Schaerli P, Britschgi M, Yawalkar N, Seitz M, Villiger PM, Pichler WJ. T cell-regulated neutrophilic inflammation in autoinflammatory diseases. *J Immunol.* 2005; 175(11): 7678-7686.
- 8) Romagnani S. Human Th17 cells. *Arthritis Res Ther.* 2008; 10(2): 206.
- 9) Amadi-Obi A, Yu CR, Liu X, Mahdi RM, Clarke GL, Nussenblatt RB, Gery I, Lee YS, Egwuagu CE. TH17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1. *Nat Med.* 2007; 13(6): 711-718.
- 10) Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, Bernard M, Giuliani F, Arbour N, Becher B, Prat A. Human TH17 lymphocytes promote

blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med.* 2007; 13(10): 1173-1175.

T. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 安岡秀剛、桑名正隆: 学術; ベーチェット病治療の新たな試み. 日本医事新報 No.44 58、日本医事新報社、東京、pp54-59, 2009.
2. 桑名正隆: 抗TNFα療法の適応拡大-関節リウマチ以外の疾患治療に向けて-; ベーチェット病. 分子リウマチ治療 3(2)、印刷中.

2. 学会発表

1. 安岡秀剛、桑名正隆: ベーチェット病(BD)の病態におけるIL-17産生T細胞の役割. 第53回日本リウマチ学会総会(東京). 2009.
4. (ワークショップ: ベーチェット病)

H. 知的財産権の出願、登録状況

20. 特許取得

なし

21. 実用新案登録

なし

22. その他

なし

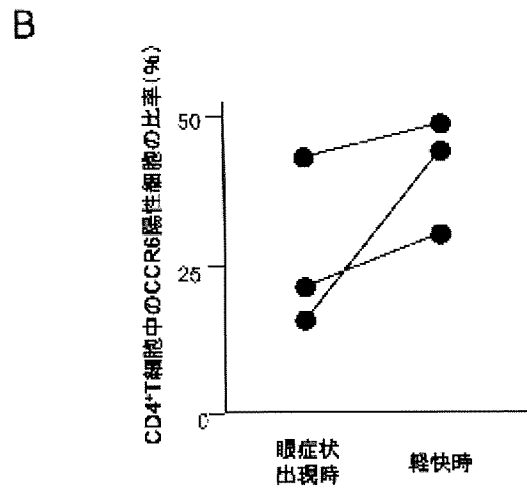
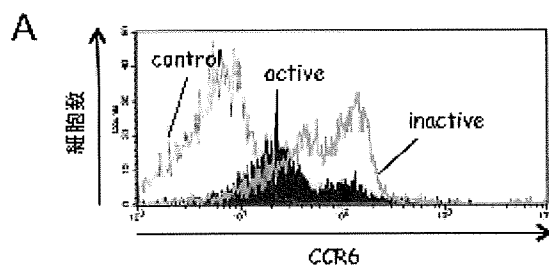


図1. 眼症状出現時と軽快時における末梢血中のCD4+細胞中のCCR6細胞の比率. A. ベーチェット病患者の代表例のフローサイトメトリー. B. 経過を観察しえた3例でのCCR6+細胞の比率の変化.

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

「ベーチェット病におけるTGF- β /Smadシグナルの定量および局在検討」

研究分担者 鈴木 登 聖マリアンナ医科大学 免疫学・病害動物学教室
清水 潤 聖マリアンナ医科大学 免疫学・病害動物学教室
金子史男 脳神経疾患研究所附属皮膚免疫・アレルギー疾患研究所
金子 栄 島根県立病院 皮膚科

研究要旨

ベーチェット病におけるTh17細胞軸の評価を行った。その結果、末梢血単核球（PBMC）において、健常人に比較しTGF- β レセプターおよびSmad2mRNAの発現亢進、IL-23レセプター、ROR-C、Foxp3mRNAの減少傾向をみた。皮膚病変局所での局在検討では、TGF- β レセプター1、リン酸化Smad2、TGF- β 1ともにCD4⁺T細胞と一部のCD8⁺T細胞に陽性であったが、TGF- β 1のみ非ベーチェット病性結節性紅斑に比較したベーチェット病での強発現がみられた。ベーチェット病T細胞でのユニークなシグナル異常が推察される。

A. 研究目的

これまでわれわれはベーチェット病の腸管および皮膚病変部でTh1優位の免疫異常が起きており病態形成に関与している可能性を報告した。

しかし近年、いわゆるTh1細胞関連と考えられていた脳・脊髄炎、関節炎の動物モデルでの、Th17細胞の中心的な役割が相次いで報告された。そこでわれわれはベーチェット病におけるTh17細胞軸からの再評価を試みた。

B. 研究方法

① 対象は活動性のあるベーチェット病患者4名、健常者8名。末梢血よりフィコール法により単核細胞(PBMC)を分離、mRNAを抽出し、real time PCR法を用いて半定量的に解析した。測定mRNAは以下。サイトカイン：IL-17、IL-17F、IL-21、IL-22、IL-23、TGF- β 1。シグナル蛋白：IL-23R、TGF- β R1、2、3、IL-6ST、STAT1、STAT3、Smad2、Smad3、

Smad7、SOCS1、SOCS3、Foxp3、ROR-C、Any1 hydrocarbon receptor (AHR)。

② さらに上記とは異なるベーチェット病患者4名の皮膚病変におけるTGF- β 1、リン酸化Smad2、TGF- β R1の局在を免疫組織学的に検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は、ヘルシンキ宣言（2008年ソウルWMA総会にて修正）の精神に基づいて実施する。実施にあたっては横浜市立大学の規約に基づいて倫理委員会での承認を得た上で実施する。

C. 研究結果

① ベーチェット病患者PBMCでは、Th17関連サイトカインmRNAは、全般に健常者に比較し低値であった。シグナル蛋白mRNAではTGF- β RおよびSmad2の明らかな上昇が認められたが、一方その下流のROR-CとFoxp3、およびIL-23Rはむしろ減少傾向にあった。

②の皮膚病変ではBD患者4名ともに多数のCD8⁺細胞を認めたが、CD4⁺細胞の浸潤をみたのは1名のみであった。

そのBD皮膚浸潤CD4⁺細胞において、非ベーチェット病結節性紅斑に比較して、明らかに強いTGF- β 1発現を認めた。

D. 考察

近年、自己免疫疾患の発症に自己反応性T細胞のみならず、抑制系T細胞の関与が推察されるようになってきている。その抑制系T細胞分化に重要と考えられているのがTGF- β /Smadシグナルである。ベーチェット病末梢血および病変皮膚における、TGF- β /Smadシグナルを中心とした伝達異常は、ベーチェット病発症機序と密接に関与するものと推察する。

E. 結論

ベーチェット病では、TGF- β /Smadシグナルを中心とした伝達異常が存在する。今後はさらにナイーブT細胞分化を観察する予定とする。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

29. Shimizu J, Yoshikawa H, Takada E, Hirose C, Suzuki N. Skewed helper T cell function in Behcet's disease. Inflammation and Regeneration. In press.

2. 学会発表

14. Shimizu J, Suzuki N, Kaneko F, Kaneko S. Accelerated expressions of interleukin-23 and Smad2 mRNA

in Behçet's disease. The 9th World Congress of Inflammation. 2009.7.6-10

15. Shimizu J, Yoshikawa H, Suzuki N, Kaneko F, Kaneko S. Accelerated expression of TGF-beta receptor and Smad2 mRNA in Behçet's disease. 第39回日本免疫学会総会・学術集会 2009.12.2-4

H. 知的財産権の出願、登録状況

23. 特許取得

なし

24. 実用新案登録

なし

25. その他

特記事項なし。