

どの患者に見られる。ブラッシング回数の増加が関連するとするならば、別要因も口腔環境に影響を与えるものかもしれない。本研究では「電子入力された臨床個人票に基づく特定疾患治療研究医療受給者調査報告書、2005、稲葉ら」のデータベースから1955-2004年に至る各発病年における人数と経済活動との相関を調べた。経済活動に伴う変化がもたらす疾病の変遷から日本に特化したパーチェット病発症者数の減少と軽症化の理由を探るため、経済活動の指標であるGDP（国内総生産）との関連性を調べた。さらに、自販機台数と清涼飲料水「電子入力された臨床個人票に基づく特定疾患治療研究医療受給者調査報告書、2005、稲葉ら」のデータベースから各発病年におけるパーチェット病発症人数と経済活動（GDP）との間での相関を調べた。また、清涼飲料水市場の変遷との関連についても検討を試みた。

## B. 研究方法

対象とした疾患は「電子入力された臨床個人票に基づく特定疾患治療研究医療受給者調査報告書」のデータベース（稲葉ら、2005）の48疾患である。GDPは国内で新たに生産されたモノやサービスの付加価値の合計額のことであり、Domestic（国内の）ゆえに日本企業が海外で生産したモノやサービスは含まない。あくまで日本国内の生産活動が数字として表現され、景気を測る指標となっている。データベースとしては内閣府データベースを基本とした。なお、以前は日本の景気を測る指標として、主としてGNP（国民総生産）が用いられてきたが、現在は国内の景気をより正確に反映する指標としてGDPが重視されている。すなわち、GNPは国内に限らず海外の日本企業の生産額も含むため、海外に生産拠点移動が著しい現状から解析には

不適當であると考えた。GDPは、国連が定めた一定のマニュアルであるSNA（System of National Account）に従い、各種の既存統計を加工することにより推計されるので、同一レベルでの国際比較が可能である。

パーチェット病では口腔アフタがほとんどのケースで初発となるため、口腔に影響を与える食事・飲料などで日本に特化し、かつ日本経済とリンクした現象を探索した。飲料自動販売機の数、売上と飲料内容の販売量に関するデータは社団法人日本自動販売機工業会および社団法人全国清涼飲料工業会から得た。このデータベースを元に飲料市場で砂糖含有飲料や茶系飲料等の売り上げとの関連からパーチェット病増加と減少時において、飲料内容の変化があるかどうかを調べた。

GDPとの相関、年度別に見た発症者人数との相関を調べるため、「電子入力された臨床個人票に基づく特定疾患治療研究医療受給者調査報告書」のデータベースでは各年度の人数（5年ごとにまとめられている）と年度を合わせるため、GDPや自販機台数、清涼飲料水売上げ金額などは5年ごとにまとめた。「電子入力された臨床個人票に基づく特定疾患治療研究医療受給者調査報告書」は1925年から2004年までのデータが記載されているが、1925-1954年までのデータは比較するための人数が統計学的に少ないため使用しなかった。したがって、解析は1955-2004年行い、ついで1970-2004年について行った。

緑茶から熱アルコール抽出法を用いて茶カテキンを抽出した。抽出物はクロマトグラフィーによって分析された。それぞれの抽出過程で得たカテキンはクロロフィル除去サンプル、活性炭処理などを行い、Deocon, Ca30EX, Ca50EXとして実験に供した。これら抽出物を用いてパーチェット病患者由来の口腔連鎖球

菌に対する緑茶カテキンの抗菌作用およびバイオフィーム形成阻害作用を調べた。

### C. 研究結果

1955-2004年のGDPとパーチェット病発症人数との関連性を知るために回帰分析を行うとパーチェット病をはじめとする多くの疾患でGDPとの強い相関を認めた。ほとんどの疾患でGDPと有意な相関を認めた。しかしながら、1955-1969年は疾病の認識・診断が十分でなかった可能性がある。これは交絡因子として本来相関がないものを統計学的に相関ありと判定している可能性があった。そこで、1970年以降に絞り相関を調べた。パーチェット病では実質GDPと有意に相関した。一方、プリオン病や網膜色素変性症では相関を認めなかった。人口補正を行っても行わなくても同様の結果を得た。

日本全体の経済活動と新規パーチェット病患者数の変化、北海道経済活動と北大新患者数の変化にはずれがある。そこで、次の条件を満足させるものは何かと考えた。1. 眼科外来数の減少が先重症化もしくは進行抑制の効果が先に出現。2. GDPとの相関から経済活動にリンクした事象。3. 発症抑制効果(口腔)と重症化抑制効果(炎症抑制)を併せ持つ事象。4. 日本特有の内容であること。5. 同じ媒体であっても増加と減少の2つの側面を持ち、時期との矛盾がないこと。この条件にあてはまるものとして飲料自動販売機の普及と砂糖含有飲料から茶系飲料へのシフトを考えた。なぜなら、1. 海外の自販機はチケットなどが主流で飲料自販機は日本独自の文化を形成している、2. 砂糖は口腔ストレプトコッカスに利用され、作られたグルカンはその定着を促進する一初発BD増加を説明、3. 熱い飲料から冷たい飲料のシフトはHSP発現を抑制—進行抑制、4. 茶系飲料は抗菌

と抗炎症作用を有する。この普及は進行抑制に関与する。実際、自販機市場はGDPと相関した(総数との相関係数0.8731、飲料で0.9031、清涼飲料で0.9168)。さらに、自販機市場と全国BD発症年患者数と自販機台数およびその売り上げは強く相関した( $P < 0.01$ )。相関係数は清涼飲料水とで0.9166、飲料で0.8740であった。

飲料は砂糖含有系と茶系に大別できる。砂糖含有系の市場は1960年から1985年にかけて拡大した(図1)。対照として記載した水市場は2000年以降から急速に伸び、パーチェット病との関連性はないといえる。茶系飲料はウーロン茶の登場(1979年)から始まり、1985年以降急速に拡大した(図2)。パーチェット病新規患者数を示したグラフをこれに合わせると、1970年から1985年に直線的に患者数が急増した時の勾配は約60度であるのに対して、1985年以降ではその勾配は約30度であった(図3)。

パーチェット病患者由来の口腔ストレプトコッカスに対して茶カテキンは抗菌作用を示した(表1)。

### D. 考察

経済活動の指標であるGDPとの相関を調べるに至った発想は日本に特化したものとして飲料自動販売機が日本全国至るところに存在するが海外ではほとんど見かけないことに関連性があるかもしれないと考えたからである。実際、飲料自販機の台数はGDPと相関した。GDPあるいはパーチェット病発症人数(発症時)と自動販売機の設置台数は有意に相関し、特に飲料販売機との相関が強かった。さらに、1970年以降を考えると飲料として砂糖入り飲料から茶系飲料へのシフトがあった。パーチェット病の増加と減少を説明し、口腔ストレプトコッカスとの関連性を示

す根拠を提供するかもしれない。なお、砂糖は口腔フローラに強い影響を与える一方、茶系飲料は抗菌と抗炎症作用を持つ。

トルコや韓国では日本とは異なり、患者数の増加や重症化などが問題となっている。GDPの国際比較を行うとその推移は日本で鈍化しており、トルコ、韓国、中国では順調な伸びを示している。経済発展に伴う行動や食生活の変化がペーチェット病の発症増加や重症化をもたらすとすれば、日本を除くハイリスクの国々では現状が継続する可能性がある。あわせて、シルクロードの国々では茶の文化を共有している。茶の種類については、どのお茶であってもカテキンは含まれることから単にお茶を飲む風習だけで説明をすることはできない。重要なことは砂糖含有の茶なのか、また茶そのものに砂糖は含有していなくても糖濃度の高い菓子を食する文化かどうかなどが関与するかもしれない。日本においてペーチェット病が増加したときは経済成長が著しい時期であり、砂糖含有飲料の売り上げも増加した。

茶は口腔細菌叢を制御するのに大きく貢献するといえる。本研究では飲料自販機の普及によって砂糖含有飲料の増加と茶系飲料へのシフトが日本に特化したペーチェット病患者の増減に関与することを示した。また、茶はペーチェット病のトリガーとなりうる口腔ストレプトコッカスに抗菌作用およびバイオフィーム形成阻害作用を示すことを明らかにした。

## E. 結論

ペーチェット病と経済活動およびそれに伴う自販機の普及は口腔フローラに影響を与え、発症抑制や軽症化に影響を与えたことが示唆された。茶カテキンは口腔ストレプトコッカスに対して抗菌およびバイオフィーム

阻害活性を示した。

## F. 健康危険情報

特記事項なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Han'gombe BM, Isogai E, Mubita C, Isogai N, Silungwe M, Chisenga C, Moonga L, Mulenga E, Yabe J, Takaya A, Yamamoto T, Kurebayashi Y, Isogai H, Detection of InvA, SpiC, SipC, InvF and HilA in Salmonella isolated from beef and poultry by Dot Blot Hybridization in Zambia, *Int J Appl Res Vet Med*, 6(1): 1-6, 2008
2. Kaneko F, Oyama N, Yanagihiro H, Isogai E, Yokota K, Oguma K. The role of streptococcal hypersensitivity in the pathogenesis of Behcet's disease. *Eur J Dermatol*. 18(5): 489-98, 2008
3. Isogai E, Isogai H, Hayashi S. Tick biology and tick-borne infections, *Current Trend in Microbiology*, 4: 1-7, 2008.
4. Mubita C, Syakalima M, Chisenga C, Munyeme M, Bwalya M, Chifumpa G, Hang'ombe BM, Sinkala P, Simuunza M, Fukushi H, Isogai H, Yasuda J, Isogai E. Antibigrams of faecal E coli and enterococci species isolated from pastoralist cattle in the interface areas of the Kafue basin in Zambia. *Veterinaski Arhi* 78(2): 179 – 185, 2008
5. Takaya A, Tabuchi F, Tsuchiya H, Isogai E, Yamamoto T. Negative regulation of quorum-sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* by ATP-dependent Lon protease. *J Bacteriol* 190(12), 4181-

- 4188, 2008
6. Isogai H, Isogai E, Takahashi K, Kurebayashi Y. Effect of catechin diet on gingivitis in cats. *Int J Appl Res Vet Med* 6(2)82-86, 2008
  7. Kobayashi-Sakamoto M, Isogai E, Hirose K, Chiba I. Role of alpha(v) integrin in osteoprotegrin-induced endothelial cell migration and proliferation. *Microvasc Res*, 76:139-144, 2008
  8. Isogai E, Isogai H, Takahashi K, Okumura K, Savage PB. Ceragenin CSA-13 exhibits antimicrobial activity against cariogenic and periodontopathic bacteria. *Oral Microbiol Immunol*, 24, 170-172, 2009
  9. Isogai E, Isogai H, Takahashi K, Kobayashi-Sakamoto M, Okumura K. Antimicrobial activity of three tick defensins and four mammalian cathelicidin-derived synthetic peptides against Lyme disease spirochetes and bacteria isolated from the midgut. *Exp Appl Acarol*, 49(3), 221-228, 2009
  10. Susuki K, Koga M, Hirata K, Isogai E, Yuki N. A Guillain-Barré syndrome variant with prominent facial diplegia. *J Neurol*, 256, 1899-1905, 2009
  11. Kawahara M, Tajima T, Torii H, Yabutani M, Ishii J, Harasawa M, Isogai E, Rikihisa Y. *Ehrlichia chaffeensis* infection of sika deer, Japan. *Emerging Infect Dis*, 15, 1991-1993, 2009
  12. Isogai H, Mulu A, Diro E, Tekleselassie H, Kassu A, Kimura K, Nishikawa T, Isogai E, Identification of *Candida* species from human immunodeficiency virus-infected patients in Ethiopia by combination of CHROMagar, Tobacco agar and PCR of amplified internally transcribed rRNA spacer region. *J Appl Res*, 10(1), 2-8, 2010
  13. Ito A, Isogai E, Yoshioka K, Sato K, Himeno N, Gotanda T, Ability of orally administrated IFN- $\alpha$ 4 to inhibit naturally occurring gingival inflammation in dogs. *J Vet Med Sci*, 72(9), 1145-1151, 2010
  14. Kobayashi-Sakamoto M, Isogai E, Holen I. Osteoprotegrin induces cytoskeletal recognition and activates FAK, Src and ERK signaling in endothelial cells. *European J Haematol* 85, 26-35, 2010
  15. Isogai E, Isogai H, Okumura K, Hori H, Tsuruta H, Kurebayashi Y. Tertiary structure-related activity of tick defensin (persulcatusin) in the taiga tick, *Ixodes persulcatus*. *Exp Appl Acar*, 53, 71-77, 2010
  16. Kitagawa R, Takaya A, Ohya M, Mizunoe Y, Takade A, Yoshida S, Isogai E, Yamamoto T. Biogenesis of *Salmonella* enteric Serovar Typhimurium membrane vesicles provoked by induction of pagC. *J Bacteriol*, 192: 5645-5656, 2010
  17. Mulu A, Diro E, Tekleselassie, Belhyhun Y, Anagaw B, Alemayehu M, Gelaw A, Biadglegne F, Desalegn K, Yifru S, Tiruneh M, Kassu A, Nishikawa T, Isogai E. Effect of Ethiopian multiflora honey on fluconazole resistant *Candida* species isolated from the oral cavity of AIDS patients, *International J STD & AIDS*, 21,1-5, 2010
  18. Isogai E, Hori H, Ando T, Yoneyama H, Isogai H, Okumura K. Antimicrobial agents for protection and treatment

against oral infectious diseases. *Res Adv Antimicrob Agents Chemother*, 1: 1-8, 2010

19. Kakudate N, Morita M, Fukuhara S, Sugai M, Nagayama M, Isogai E, Kawanami M, Chiba I, Development of the outcome expectancy scale for self-care among periodontal disease patients. *J Evaluation Clin Practice*, in press, 2010
20. Hori H, Ando T, Isogai E, Yoneyama H, and Katsumata R. Identification of an L-alanine export system in *Escherichia coli* and isolation and characterization of export deficient mutants. *FEMS Microbiol Lett*, in press, 2010

## 2. 国際学会発表

1. Isogai E, Isogai H, Okumura K, Kobayashi-Sakamoto M, Kaneko F, Ohgami K, Ohno S, Savage PB, Functional properties of cationic antimicrobial compounds on the neutrophils and endothelial cells, 13<sup>th</sup> International Conference for Behcet's disease, Klagenfurt, May 24-27, 2008
2. Isogai H, Isogai E, Okumura K, Kobayashi-Sakamoto M, Kaneko F, Ohgami K, Ohno S, Savage PB. Protective effects of antimicrobial steroid(CSA-13)against bacterial infection with ocular manifestations. 13<sup>th</sup> International Conference for Behcet's disease, Klagenfurt, May 24-27, 2008
3. Kaneko F, Oyama N, Yanagihori H, Isogai E, Yokota K, Oguma K, Role of oral streptococci in the pathogenesis of Behcet's disease. 13<sup>th</sup> International Conference for Behcet's disease, Klagenfurt, May 24-27, 2008
4. Isogai E, Isogai H, Takahashi K, Kobayashi-Sakamoto M, Pathogenesis of skin lesions in Lyme disease, 11<sup>th</sup> International Conference on Lyme Borreliosis and other tick-borne diseases, Irvine, USA, Oct. 19-23, 2008
5. Isogai H, Isogai E, Antimicrobial activity of tick defensins against Lyme disease spirochetes and bacteria isolated from the midgut, 11<sup>th</sup> International Conference on Lyme Borreliosis and other tick-borne diseases, Irvine, USA, Oct. 19-23, 2008
6. Isogai E, Isogai H, Okumura K, Savage PB. Inhibitory effect of cationic-steroid-antibiotics on biofilm formation by *Streptococcus mutans*. 9<sup>th</sup> World Congress on Preventative Dentistry, Phuket, Thailand, 2009
7. Isogai H, Isogai E, Mulu A, Kassu A, Diro E, Tekleselassie H, Nishikawa T. *Candida* species isolated from HIV-infected persons in Ethiopia. 9<sup>th</sup> World Congress on Preventative Dentistry, Phuket, Thailand, September, 2009
8. Kobayashi-Sakamoto M, Isogai E, Hirose K, Peid P, Chiba I, Holen I. Osteoprotegerin-mediated cytoskeletal reorganization in microvascular endothelium, 87th IADR, Miami, Florida, April 1-4, 2009
9. Ohno S, Isogai E, Isogai H, Kaneko F, Namba K, Sato K, Kitaichi N. Why does Behcet's disease decline in Japan-Possible association between economic development and decreased risk of Behcet's disease. 14<sup>th</sup> International Conference of Behcet's disease. 8<sup>th</sup>-10<sup>th</sup> July, 2010, London
10. Okumura K, Sawada N, Isogai E,

Kobayashi-Sakamoto M, Taira H, Shibata T, Isogai H. A human cathelicidin hCAP18 inhibits tube formation in endothelial cells. IADR July 14-17, 2010 Barcelona, Spain

11. Kobayashi-Sakamoto M, Isogai E, Hirose K, Holen I, Chiba I. Characterization of osteoprotegrin-induced signaling in human endothelial cells. IADR July 14-17, 2010 Barcelona, Spain
12. Kobayashi D, Kobayashi-Sakamoto M, Isogai E, Chiba I. Inhibition of angiogenesis and cell proliferation by royal jelly- Inhibition of transforming growth factor-beta production by royal jelly in endothelial cells and periodontal ligament fibroblasts- IADR July 14-17, 2010 Barcelona, Spain

H. 知的財産権の出願、登録状況  
なし

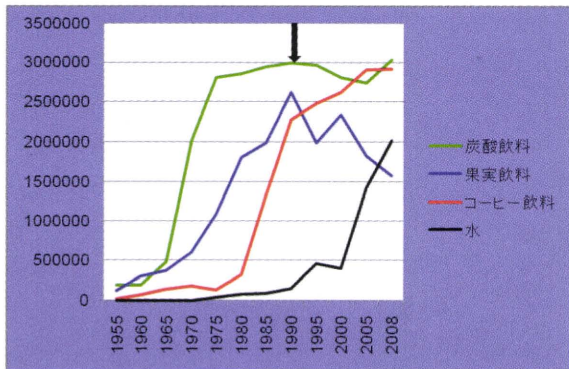


図1. 砂糖含有系飲料の生産量(kl)の推移

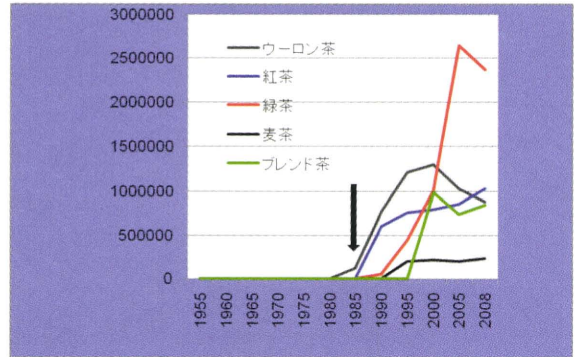


図2. 茶系飲料の生産量(kl)の推移

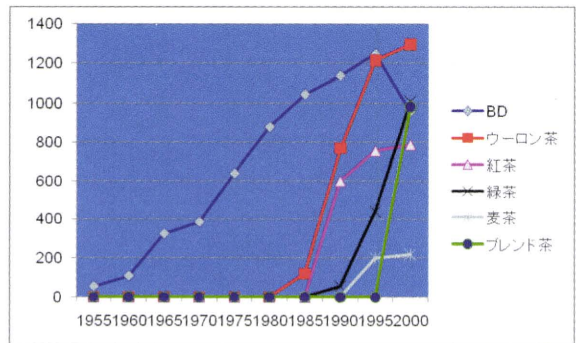
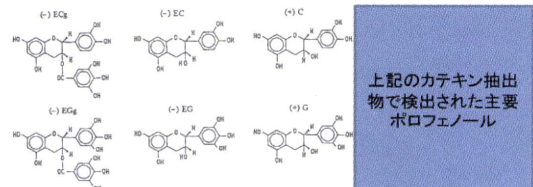


図3. ベーチェット病新規患者数と茶系飲料の生産量(kl)の推移

表1. ベーチェット病患者由来口腔ストレプトコッカスに対する茶カテキンの抗菌活性

Streptococcus used		MIC(mg/ml)		
		Deocon	Ca30EX	Ca50EX
<i>S.oralis</i>	BD113-20	0.4	0.4	0.2
<i>S.oralis</i>	BD114-23	0.8	0.8	0.4
<i>S.sanguinis</i>	BD118-1	0.4	0.4	0.4
<i>S.gordonii</i>	ATCC10556	0.8	0.8	0.4
<i>S.sanguinis</i>	ATCC10557	0.4	0.4	0.4



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

全ゲノム網羅的SNP解析によるベーチェット病の感受性遺伝子の同定

研究分担者 水木信久 横浜市立大学医学部眼科学教室

研究協力者 目黒 明<sup>1)</sup> 太田正穂<sup>2)</sup> 河越龍方<sup>1)</sup> 南場研一<sup>3)</sup>

大野重昭<sup>4)</sup> 北市伸義<sup>5)</sup> 岳野光洋<sup>6)</sup> 石ヶ坪良明<sup>6)</sup>

杉田 直<sup>7)</sup> 望月 學<sup>7)</sup> 猪子英俊<sup>8)</sup>

- 1) 横浜市立大学医学部眼科学 2) 信州大学医学部法医学  
3) 北海道大学大学院医学研究科視覚器病学 4) 北海道大学大学院医学研究科炎症眼科学  
5) 北海道医療大学個体差医療科学センター眼科 6) 横浜市立大学医学部病態免疫制御内科学  
7) 東京医科歯科大学医学部眼科学 8) 東海大学医学部分子生命科学

研究要旨

ベーチェット病はHLAクラス I 領域（HLA-B51、HLA-A26）と顕著に相関することが知られているが、本病発症にはHLA遺伝子以外の他の遺伝子も関与している可能性が示唆される。そこで我々は全染色体を網羅する約50万個のSNP（Affymetrix GeneChip Human Mapping 500K Array Set）を用いて、ゲノムワイドな相関解析（genome-wide association study：GWAS）を行うことにより、本病の新たな疾患感受性遺伝子の同定を試みた。

日本人ベーチェット病患者612例および健常者740例を対象としたGWASおよびトルコ人集団（患者1,215例、健常者1,279例）と韓国人集団（患者119例、健常者140例）を対象とした追認試験（replication study）を完了し、HLA領域以外に人種を超えて本病と有意に相関する2個の遺伝子領域、IL10およびIL23R-IL12RB2を見出した。IL10遺伝子およびIL23R遺伝子またはIL12RB2遺伝子は免疫応答に直接関与する遺伝子であり、ベーチェット病の有力な疾患感受性遺伝子であることが示唆された。

**A. 研究目的**

ベーチェット病は全身の諸臓器に急性の炎症を繰り返す原因不明の難治性疾患である。本病は内的遺伝因子の関与のもとに何らかの外的環境因子が作用して発症する多因子疾患と考えられている。内的遺伝因子としてHLAクラス I 遺伝子（HLA-B51、HLA-A26）との顕著な相関が知られているが、本病発症にはHLA遺伝子以外の他の遺伝子も関与している可能性が示唆される。そこで我々はゲノム全域を網羅する約50万個のSNPを用

いてゲノムワイドな相関解析（genome-wide association study:GWAS）を行うことにより、HLA遺伝子以外の他の本病感受性遺伝子の同定を試みた。

**B. 研究方法**

- ① 日本人ベーチェット病患者612例および健常者740例を対象にAffymetrix社のGeneChip Human Mapping 500k Array Setを用いてGWASを行う。解析方法はAffymetrix社のプロトコルを準拠して行う。本GWASでは、

集団の階層化またはホモ接合過剰を示す検体を除外した上で、Quality Control (QC) (SNP callが95%以上、マイナーアリル頻度が5%以上、健常者におけるハーディーワインバーグ平衡がP値0.001以上)を満たすSNPを対象に統計解析を行う。

- ② GWASを完了した後、トルコ人集団を対象に本病のGWASを実施する海外のグループとデータの相互評価 (cross-validation) を行い、疾患感受性領域を絞り込む。
- ③ 絞り込まれた遺伝子領域を対象に詳細なSNP解析 (fine mapping) を行い、本病と最も有意に相関するSNPを特定する。
- ④ fine mappingにより特定されたSNPを対象にトルコ人集団 (患者1,215例、健常者1,279例) および韓国人集団 (患者119例、健常者140例) を用いて追認試験を行い、再現性を検討する。

#### (倫理面への配慮)

全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 患者612例、健常者740例を対象に500,568個のSNPのジェノタイピングを行った (GWAS)。集団の階層化またはホモ接合過剰を示す検体 (患者1例、健常者3例) を除外した上で、患者611例および健常者737例を対象に500,568個のSNPについてQCチェックを行い、QCを満たす320,438のSNP

について統計解析を行った。

HLA-B遺伝子領域に最も強固な相関、HLA-A遺伝子領域に2番目に強固な相関があり、それぞれ本病の第1および第2の疾患感受性遺伝子と考えられた (図1)。これらの結果は、以前の我々の報告を支持するものである。HLA領域以外では、P値0.0001未満で相関する35個の遺伝子領域が認められた。

- ② トルコ人集団対象のGWASとデータの相互評価を行ったところ、HLA-B、HLA-A、IL10、IL23R-IL12RB2の遺伝子領域が人種を超えて本病と強く相関することが認められた。
- ③ IL10およびIL23R-IL12RB2の2領域を対象に詳細なSNP解析 (fine mapping) を行い、この2領域において日本人ベーチェット病と最も強く相関するSNPを特定した (図2)。
- ④ ③で特定したIL10およびIL23R-IL12RB2の2領域のSNPについて、トルコ人集団および韓国人集団を対象に追認試験を行い、日本人集団と同様の強い相関が認められた (表1)。
- ⑤ 発現解析により、ベーチェット病のIL10リスクSNP (rs1800872) と相関して、IL-10のmRNA発現の低下が認められた。

### D. E. 考察と結論

ゲノム全域を網羅する約50万個のSNPを用いたGWASにより、HLA領域以外に位置するベーチェット病の感受性遺伝子領域、IL10とIL23R-IL12RBを同定した。

ベーチェット病は以前からHLA-B51分子との関係が示唆されており、本病の第一の疾患感受性遺伝子であることは疑いない。また、近年、HLA-A26分子も本病の発症に強く関わっていることがわかってきた。した



がって、本病発症の最初の免疫応答は何らかの病原となる抗原（病因抗原）をHLA分子が認識して発動されると考えられる。ベーチェット病ではTh1優位の免疫応答が惹起されており、IFN- $\gamma$ を介して、細胞傷害性T細胞やNK細胞を活性化させる（細胞性免疫）。細胞傷害性T細胞の表面には、HLAクラスI分子が発現しているため、HLA-B51分子やHLA-A26分子を保有している人では、この段階で過剰な免疫応答が惹起されていくと考えられる。今回のGWASの解析では、Th1細胞に発現しているIL-12レセプター、Th17細胞に発現しているIL-23レセプターおよびTh1系の免疫応答に抑制的に働くIL-10分子にベーチェット病と関連する遺伝変異が発見された。Th1細胞はIL-12により分化・誘導され、その働きはIL-10により抑制されている。今回、IL-10の発現量を低下させるような遺伝変異がベーチェット病で示唆された。また、IL-12のレセプター領域にも本病と関連した遺伝変異が示唆され、IL-12に対する反応性が異なっている可能性（IL-12に対する易刺激性の亢進）が考えられる。したがって、今回見つかった本病の遺伝変異は、Th1系の免疫応答を抑制するサイトカインであるIL-10の発現を低下させ、また一方で、Th1細胞の易刺激性を亢進するような変異であるのではないかと（どちらも結果的にTh1系免疫応答を活性化すると推察される）と推察される。

また、今回、IL-23のレセプター遺伝子領域にも本病に関わる遺伝変異が見つかった。IL-23レセプターはTh17細胞やマクロファージに発現しており、IL-23はTh17細胞の増殖と維持、活性化に関与する。近年、Th17細胞は細胞外細菌排除などの感染防御、好中球炎症や自己免疫疾患発症に深く関わっていることが示唆されている。ベーチェット病では、以前より、特殊な連鎖球菌に対する免疫応答

（感染防御）が亢進しており、これらの細菌感染が疾患発症のトリガーになっている可能性が示唆されていた。そして、それにより好中球が病巣に異常に遊走され、好中球自体の機能も亢進して暴走していることが本病病態を形成していると考えられていた。したがって、今回の解析で得られた、IL-23レセプターの遺伝変異により、このTh17細胞のIL-23に対する易刺激性が亢進して、本病発症に促進的に働いている可能性が考えられる。

以上をまとめると、ベーチェット病では、その病因となる外来抗原がHLA分子を介して、最初の免疫応答を惹起させ、その後、Th1系免疫応答、Th17系免疫応答が発動されていく過程で、それらの細胞表面のレセプター分子（IL-12レセプターやIL-23レセプター分子）の異常や、それらを制御するサイトカイン（IL-10分子）の異常などにより、これらの免疫系が加速・進展していき、歯止めもかけられない状態に陥っているのではないかと考えられる。このように、今回のGWASでベーチェット病発症に関わる遺伝変異が非HLA遺伝子であるIIL23R-IL12RB2とIL10の2遺伝領域に見つかったことは、本病の病態の解明およびそれらのサイトカインを制御する生物製剤の開発の上で大変意義深い。

## F. 健康危険情報

特記事項なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Mizuki N, Meguro A, Ota M, Ohno S, Shiota T, Kawagoe T, Ito N, Kera J, Okada E, Yatsu K, Song YW, Lee EB, Kitaichi N, Namba K, Horie Y, Takeno M, Sugita S, Mochizuki M, Bahram S, Ishigatsubo Y, Inoko H. Genome-

- wide association studies identify IL23R-IL12RB2 and IL10 as Behcet's disease susceptibility loci. *Nat Genet.* 2010;42(8):703-6.
2. 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 disease inside and outside the MHC. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(4):747-54.
  3. Suzuki M, Meguro A, Ota M, Nomura E, Kato T, 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. Genotyping HLA-DRB1 and HLA-DQB1 alleles in Japanese patients with normal tension glaucoma. *Mol Vis.* 2010;16:1874-9.
  4. Kurata R, Nakaoka H, Tajima A, Hosomichi K, Shiina T, Meguro A, Mizuki N, Ohono S, Inoue I, Inoko H. TRIM39 and RNF39 are associated with Behcet's disease independently of HLA-B\*51 and -A\*26. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;401(4):533-7.
  5. Suzuki M, Noda K, Kubota S, Hirasawa M, Ozawa Y, Tsubota K, Mizuki N, Ishida S. Eicosapentaenoic acid suppresses ocular inflammation in endotoxin-induced uveitis. *Mol Vis.* 2010;16:1382-8.
  6. Yamaguchi Y, Takahashi H, Satoh T, Okazaki Y, Mizuki N, Takahashi K, Ikezawa Z, Kuwana M. Natural killer cells control a T-helper 1 response in patients with Behcet's disease. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(3):R80.
  7. Writing Committee for the Normal Tension Glaucoma Genetic Study Group of Japan Glaucoma Society, Meguro A, Inoko H, Ota M, Mizuki N, Bahram S. Genome-wide association study of normal tension glaucoma: common variants in SRBD1 and ELOVL5 contribute to disease susceptibility. *Ophthalmology.* 2010;117(7):1331-8.
  8. Murakami K, Meguro A, Ota M, Shiota T, 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. Analysis of microsatellite polymorphisms within the GLC1F locus in Japanese patients with normal tension glaucoma. *Mol Vis.* 2010;16:462-6.
  9. Omoto S, Kuroiwa Y, Otsuka S, Baba Y, Wang C, Li M, Mizuki N, Ueda N, Koyano S, Suzuki Y. P1 and P2 components of human visual evoked potentials are modulated by depth perception of 3-dimensional images. *Clin Neurophysiol.* 2010;121(3):386-91.
  10. Wang HB, Kondo A, Yoshida A, Yoshizaki S, Abe S, Bao LL, Mizuki N, Ichino M, Klinman D, Okuda K, Shimada M. Partial protection against SIV challenge by vaccination of adenovirus and MVA vectors in rhesus monkeys. *Gene Ther.* 2010;17(1):4-13.

## H. 知的財産権の出願、登録状況

特記事項なし。

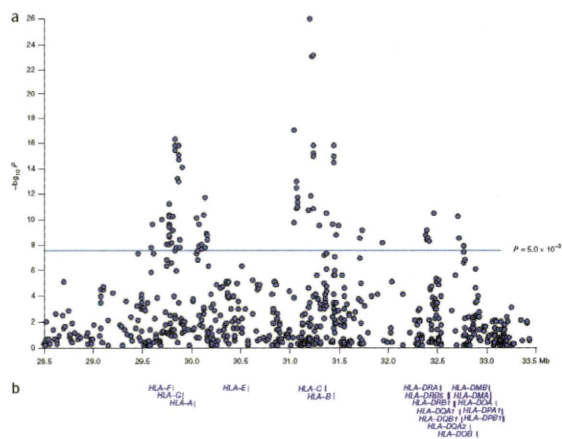


図1. 日本人を対象としたGWASにおけるHLA領域の相関

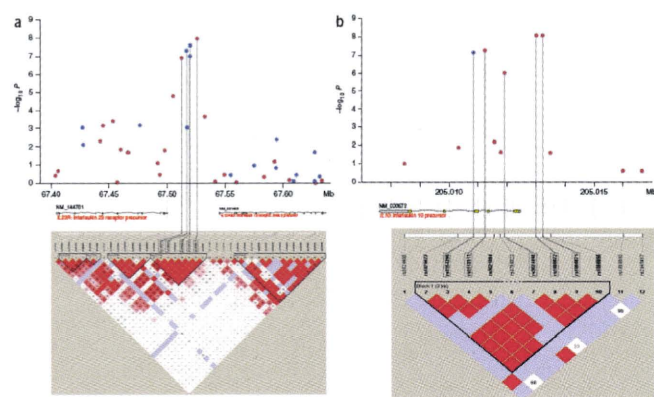


図2. IL23R-IL12RB2およびIL10領域における詳細なSNP解析

表1. IL23R-IL12RB2およびIL10領域Top-signal SNPの各民族における相関

SNP	Chr. position <sup>a</sup>	Nearest gene	Risk allele	Population	N		Risk allele frequency		P <sup>b</sup>	OR for risk allele (95% CI)
					Cases	Controls	Cases	Controls		
rs1495965	67,526,096	IL23R-IL12RB2	G	Japanese	611	737	0.563	0.451	1.2 × 10 <sup>-6</sup>	1.56 (1.34–1.83)
				Turkish	1,215	1,279	0.568	0.512	8.4 × 10 <sup>-6</sup>	1.25 (1.12–1.40)
				Korean	119	140	0.560	0.486	0.094	1.35 (0.95–1.91)
				Overall					1.9 × 10 <sup>-11</sup>	1.35 (1.24–1.47)
rs1800872	205,013,030	IL10	A	Japanese	611	737	0.765	0.664	9.5 × 10 <sup>-9</sup>	1.64 (1.39–1.95)
				Turkish	1,215	1,279	0.384	0.315	6.1 × 10 <sup>-7</sup>	1.35 (1.20–1.52)
				Korean	119	140	0.776	0.694	0.038	1.52 (1.02–2.28)
				Overall					2.1 × 10 <sup>-14</sup>	1.45 (1.32–1.59)
rs1800871	205,013,257	IL10	T	Japanese	611	737	0.765	0.664	9.5 × 10 <sup>-9</sup>	1.64 (1.39–1.95)
				Turkish	1,215	1,279	0.383	0.313	3.1 × 10 <sup>-7</sup>	1.36 (1.21–1.54)
				Korean	119	140	0.774	0.694	0.044	1.51 (1.01–2.25)
				Overall					1.0 × 10 <sup>-14</sup>	1.45 (1.32–1.60)

<sup>a</sup>NCBI build 36; all SNPs were located on chromosome 1. <sup>b</sup>P values for each population were calculated using an allele-based test; overall P values and ORs in three populations were calculated using the Mantel-Haenszel method.

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

新規ベーチェット病感受性遺伝子TRIM39の同定から機能解析に向けて

研究分担者 猪子 英俊 東海大学医学部分子生命科学  
研究協力者 倉田 里穂 東海大学医学部分子生命科学  
中岡 博史 東海大学医学部分子生命科学  
田嶋 敦 東海大学医学部分子生命科学  
米沢 朋 東海大学医学部分子生命科学  
細道 一善 東海大学医学部分子生命科学  
斉藤 卓磨 東海大学医学部分子生命科学  
椎名 隆 東海大学医学部分子生命科学  
井ノ上逸朗 東海大学医学部分子生命科学  
目黒 明 横浜市立大学大学院医学研究科視覚器病態学  
水木 信久 横浜市立大学大学院医学研究科視覚器病態学  
大野 重昭 北海道大学大学院医学研究科医学専攻炎症眼科学講座

研究要旨

多因子疾患のベーチェット病（BD）は、発症に遺伝要因が大きく関与し、これまでにヒト組織適合性抗原（HLA）のHLA-B\*51と HLA-A\*26の関与が様々な民族集団において報告されてきたが、他にも感受性遺伝子が存在することが考えられる。

HLA領域におけるマイクロサテライト（MS）の関連解析によって見出された新規感受性領域を網羅するSNPの多重回帰分析を行った。その結果、RNF39とTRIM39がHLA-B\*51, HLA-A\*26と独立してBDと関連することを明らかにした。また、ハプロタイプ解析により、それらの遺伝子もそれぞれ独立して関連することが明らかになった。また、HLA-B\*51とHLA-A\*26の効果に新規感受性2 SNPsの効果を合わせることで、BD発症予測効果が向上した。

A. 研究目的

ベーチェット病（Behcet's disease: BD）は口腔粘膜のアフタ性潰瘍、外陰部潰瘍、皮膚症状、眼症状（ぶどう膜炎）を主症状とする慢性再発性の全身性炎症性疾患で、主症状以外に関節炎、副睾丸炎、消化器病変、血管病変、中枢神経病変が報告されており、諸臓器に急性炎症を引き起こすこともある。全身性の疾患でありながら特定の臓器に症状が現れる傾向が強く、特殊な病態を示す。失

明や度重なる炎症応答による症状は患者のQuality of life (QOL) を著しく低下させる重大な疾患である。

病因としては、地中海から東アジアにかけてのシルクロード沿いに患者が非常に多く、発症に地域特異性があることや、患者の家族内で発症頻度が高いことなどから、BD発症には遺伝要因が重要であると考えられている。

BDが自己免疫疾患であることから、これまでにヒト組織適合性抗原（Human

Leukocyte Antigen: HLA) 遺伝子についての関連解析が行われ、HLA-B\*51, HLA-A\*26がBD感受性アリルであることが様々な民族集団において報告されてきた。しかし、HLA-B\*51, HLA-A\*26を保有しない患者が少なくないことや、病態の複雑さから、BDが多因子疾患であり、他の感受性遺伝子の存在が考えられる。実際、HLA領域を網羅するマイクロサテライト(Microsatellite: MS)マーカーによる関連解析によって、HLA-からHLA-Eの間の領域に位置し、HLA-B, HLA-Aとは別の連鎖不平衡(linkage disequilibrium: LD)にある2個のMS(D6S1103i, 6S0014i)がBDと関連した。また、この領域には免疫に関与するTRIM遺伝子6個がこのMSを挟んでクラスターを形成して位置しており、それらTRIMsもBD発症に関与する可能性が考えられる。

これらのことから、HLA-AからHLA-Eの間の新規BD感受性領域について、網羅的に一塩基置換(Single nucleotide polymorphism: SNP)関連解析を行い、この領域を規定する新規感受性遺伝子を特定することを目的とした。

## B. 研究方法

### B-1. 検体

横浜市立大学または北海道大学保有の非血縁日本人BD患者、日本人健常者各384検体のゲノムDNAを用いた。また、これらの検体はヘルシンキ宣言に従って倫理面に配慮した。

### B-2. SNPの選定法およびタイピング法

HapMap (International HapMap Project: <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>) の日本人のSNPデータベース (Japanese in Tokyo: JTP) より、新規感受性領域に位置するSNPのうち、SNPプローブのIllumina design scoreが0.6以上で、タンパク質をコードするSNPまたはマ

イナーアリアル頻度が5%以上かつペアワイズのLD ( $r^2$ ) 値が0.9より低いSNPを135 SNPs選定し、BeadsXpress (Illumina) を用いてGoldenGate法でタイピングした。

### B-3. クオリティーコントロール法

擬陽性を減らすために、PLINKを用いてデータセットをフィルタリングした。検体については、遺伝子型の欠失が5%以上の検体を除外した。SNPについては、遺伝子型の欠失が5%以上、マイナーアリアル頻度が1%以下、ハーディーワインバーグ平衡(Hardy-Weinberg's equilibrium: HWE)検定のP値が $1.0 \times 10^{-3}$ 以下のSNPを除外した。

### B-4. SNP関連解析法

クオリティーコントロールのフィルタリングで残った、患者382 検体、健常者382 検体、126 SNPsについて、HLA-B\*51とHLA-A\*26の影響を排除するために、HLA-B\*51とHLA-A\*26を交絡因子としたロジスティック回帰分析を行った。多重性による擬陽性を除くためにボンフェローニの補正を行い、有意水準を $3.97 \times 10^{-4}$  (= 0.05/126) に設定した。

有意差を示したSNPsは互いにLDにあるので、相対的に重要なSNPを評価するために、ステップワイズ・ロジスティック回帰分析を行った。また、両回帰分析にはSAS ver.9(SAS Inst. Inc.)を用いた。

### B-5. ハプロタイプ解析法

LD構造を可視化するために、SNPAlyze Pro7.0 (Dynacom) を用いてLD Mapを作製した。また、ハプロタイプ構造を詳細に理解するために、BEAGLE 3.3を用いてハプロタイプ解析を行った。

## B-6. BD発症の予測効果の検討法

BD発症の予測効果（BD患者と健常者の分類の性能）を評価するためにreceiver operating characteristic (ROC) 曲線を描き、ROC曲線下の面積（Area under the curve: AUC）を算出した。

## C. 研究結果

### C-1. SNP関連解析

HLA-B\*51とHLA-A\*26を交絡因子としたロジスティック回帰分析の結果、13 SNPsがHLA-B\*51, HLA-A\*26と独立して関連した（表1）。さらにステップワイズ・ロジスティック回帰分析を行い、RNF39近傍に位置するrs9261365とTRIM39上に位置するrs2074474の2SNPsが残った（表2）。また、他の11SNPsはrs9261365またはrs2074474のLDにあった。

### C-2. ハプロタイプ解析

関連した13SNPsのLDは2つのブロックに分かれた（図1）。

HLA-B\*51, HLA-A\*26とBD新規感受性2 SNPs (rs9261365, rs2074474) の4アレルから構成されるハプロタイプ構造をBD患者-健常者間で比較したところ、BD患者のハプロタイプ構造が崩れていた（図2）。

BD新規感受性2 SNPsの関連解析結果は表3に示した。両アレルともリスクでないハプロタイプと比較して、片アレルがリスクであるハプロタイプはBDと関連した（H2: OR, 1.58; 95% CI, 0.77-3.22, H3: OR, 1.53; 95% CI, 1.23-1.91）。両アレルともリスクであるハプロタイプはさらに強い関連を示し（OR, 2.50; 95% CI, 1.80-3.47）、このことから、両アレルともそれぞれ独立して関連することが証明された。

### C-3. BD発症の予測効果の検討

ROC曲線を i) BD新規感受性2 SNPs, ii) HLA-B\*51とHLA-A\*26, iii) BD新規感受性2SNPsと両HLAアレルについて描いた（図3）。AUCはそれぞれ、0.62, 0.73, 0.77であった。新規感受性2SNPsのBD発症予測効果はHLA-B\*51とHLA-A\*26より弱いですが、合わせることでより向上した。

## D. 考察

ベーチェット病の重要な新規感受性SNPとして2 SNPsを同定した。rs9261365はRNF39の上流14kbに位置し、rs2074474はTRIM39のexon 9のSPRYドメイン上に位置している。このことから、RNF39, TRIM39を新規BD感受性遺伝子として同定した。

rs4704744はTRIM39のSPRYドメイン上に位置するSNPで、アミノ酸置換を起こさないSNP (silence SNP: sSNP) である。近年、sSNPやイントロンに位置するSNPが遺伝子の発現量に影響を与え、多因子疾患はそれらの蓄積により起こると考えられている。ことから、rs4704744はTRIM39の発現量に影響を与えることでBD発症に関与する可能性がある。しかしながら、TRIM39を含むTRIMファミリー遺伝子についての研究歴は浅く、機能や発現などの情報はほとんど報告されていない。しかし、一部のTRIM遺伝子がHIV-1 (Human immunodeficiency virus-1) などのウイルスや細菌感染、リウマチ、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患、中枢神経系の発生や分化に関与することからも、TRIM39がBD発症に関与することが予想される。

本研究を創薬や臨床に応用させるために、TRIM39がBD発症のどのステージでどのように関与するかについて明らかにする必要がある。我々は、その第一段階として、

TRIM39の機能解析を行っている。

## E. 結論

RNF39とTRIM39が既知の感受性アリル HLA-B\*51, HLA-A\*26と独立してBDの発症に関与する。

## F. 健康危険情報

特記事項なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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, 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.
6. Ikamio 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* 3: 183-188, 2009.
7. Tomiyama R, Meguro A, Ota M, Katsuyama Y, Nishida 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* 70: 41-44, 2009.

8. 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 Behçet's disease in a Korean population. *Rheumatology* 48: 638-642, 2009.
9. Shojima J, Tanaka G, Keicho N, Tamiya G, Ando S, Oka A, Inoue Y, Suzuki K, Sakatani M, Okada M, Kobayashi N, Toyota E, Kudo K, Kajiki A, Nagai H, Kurashima A, Oketani N, Hayakawa H, Takemura T, Nakata K, Ito H, Morita T, Matsushita I, Hijikata M, Sakurada S, Sasazuki T, Inoko H: Identification of MICA as a Susceptibility Gene for Pulmonary Mycobacterium avium Complex Infection. *J Infect Dis* 199: 1707-1715, 2009.
10. Kongmaroeng C, Romphruk A, Ruangwerayut R, Paupairoj C, Leelayuwat C, Inoko H, Romphruk A: HLA-B\*15 subtypes in Burmese population by sequence-based typing. *Tissue Antigens*. 2009.
11. 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. *Clin Ophthalmol* 3: 307-312, 2009.
12. Romphruk AV, Romphruk A, Naruse TK, Raroengjai S, Paupairoj C, Inoko H, Leelayuwat C: Polymorphisms of NKG2D ligands: diverse RAET1/ULBP genes in northeastern Thais. *Immunogenetics*. 61: 611-617, 2009.
13. Mizuki N, Meguro A, Ota M, Ohno S, Shiota T, Kawagoe T, Ito N, Kera J, Okada E, Yatsu K, Song YW, Lee EB, Kitaichi N, Namba K, Horie Y, Takeno M, Sugita S, Mochizuki M, Bahram S, Ishigatsubo Y, Inoko H: Genome-wide association studies identify IL23R-IL12RB2 and IL10 as Behçet's disease susceptibility loci. *Nature Genet* 42: 703-706, 2010.
14. Kurata R, Nakaoka H, Tajima A, Hosomichi K, Shiina T, Meguro A, Mizuki N, Ohono S, Inoue I, Inoko H: TRIM39 and RNF39 are associated with Behçet's disease independently of HLA-B\*51 and -A\*26. *Biochem Biophys Res Commun* 401: 533-537, 2010.
15. Ikewaki N, Nakaichi M, Mizuno T, Takamura N, Tokunaga J, Ogata K, Inoko H, Otsu R: Anti-human very late antigen-alpha4(CD49d) monoclonal antibody (BU49) cross-reacts with the canine B-cell leukemia cell line GL-1, resulting in the induction of homotypic cell aggregation. *Cell Immunol* 263: 55-64, 2010.
16. Murakami K, Meguro A, Ota M, Shiota T, 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: Analysis of microsatellite polymorphisms



within the GLC1F locus in Japanese patients with normal tension glaucoma. *Mol Vis* 16: 462-466, 2010.

17. Writing Committee for the Normal Tension Glaucoma Genetic Study Group of Japan Glaucoma Society, Meguro A, Inoko H, Ota M, Mizuki N, Bahram S: Genome-wide association study of normal tension glaucoma: common variants in SRBD1 and ELOVL5 contribute to disease susceptibility. *Ophthalmology* 117: 1331-1338, 2010.
18. Suzuki M, Meguro A, Ota M, Nomura E, Kato T, 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: Genotyping HLA-DRB1 and HLA-DQB1 alleles in Japanese patients with normal tension glaucoma. *Mol Vis* 16: 1874-1879, 2010.

## 2. 学会発表

1. 倉田里穂, 斉藤卓磨, 細道一善, 目黒明, 水木信久, 椎名 隆, 井ノ上逸朗, 猪子英俊、パ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年会、12月2008年
2. 倉田里穂, 中岡博史, 田嶋 敦, 斉藤卓磨, 細道一善, 椎名 隆, 目黒 明, 水木信久, 井ノ上逸朗, 猪子英俊、パーチェット病感受性領域のSNP関連解析、第8回生体機能研究会、8月2009年
3. 倉田里穂, 中岡博史, 田嶋 敦, 斉藤卓磨, 細道一善, 椎名 隆, 目黒 明, 水木信

久, 井ノ上逸朗, 猪子英俊、パーチェット病感受性領域のSNP関連解析から病態解明、日本人類遺伝学会第54回大会、9月2009年

4. Riho Kurata, Hirofumi Nakaoka, Atsushi Tajima, Takuma Saito, Kazuyoshi Hosomichi, Takashi Shiina, Akira Meguro, Nobuhisa Mizuki, Hidetoshi Inoko, Ituro Inoue. SNP association study of Behcet's disease to unravel the genetic susceptibility and pathoetiology. THE AMERICAN SOCIETY OF HUMAN GENETICS 59th Annual Meeting. October, 2009.
5. 倉田里穂, 中岡博史, 田嶋 敦, 斉藤卓磨, 細道一善, 椎名 隆, 目黒 明, 大野重昭, 水木信久, 井ノ上逸朗, 猪子英俊、パーチェット病の新規感受性遺伝子TRIM39、第9回生体機能研究会、7月2010年
6. 倉田里穂, 中岡博史, 田嶋 敦, 斉藤卓磨, 細道一善, 椎名 隆, 目黒 明, 大野重昭, 水木信久, 井ノ上逸朗, 猪子英俊、HLA領域に位置する新規パーチェット病感受性遺伝子、第19回日本組織適合性学会大会、9月2010年
7. 倉田里穂, 中岡博史, 田嶋 敦, 斉藤卓磨, 細道一善, 椎名 隆, 目黒 明, 大野重昭, 水木信久, 井ノ上逸朗, 猪子英俊、パーチェット病の新規感受性遺伝子TRIM39、日本人類遺伝学会第55回大会、10月2010年
8. 倉田里穂, 中岡博史, 田嶋 敦, 斉藤卓磨, 細道一善, 椎名 隆, 目黒 明, 大野重昭, 水木信久, 井ノ上逸朗, 猪子英俊、パーチェット病の新規感受性遺伝子TRIM39、第33回日本分子生物学会年会、12月2010年

## H. 知的財産権の出願、登録状況

なし

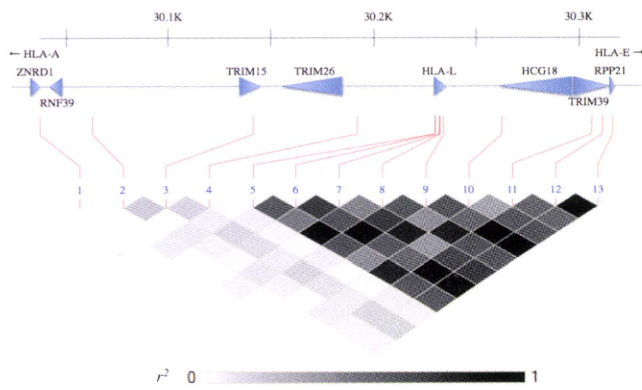


図1. BDと関連した13 SNPsのLD構造

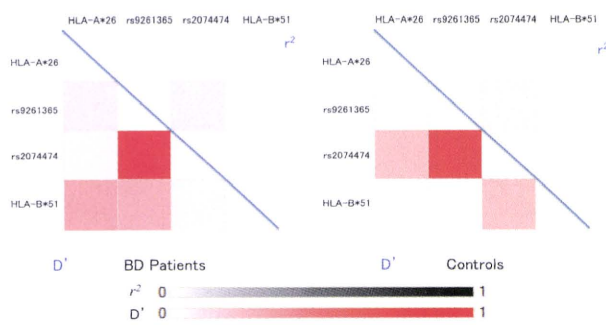


図2. 健常者群と比較して、BD患者群では連鎖不平衡が崩れている

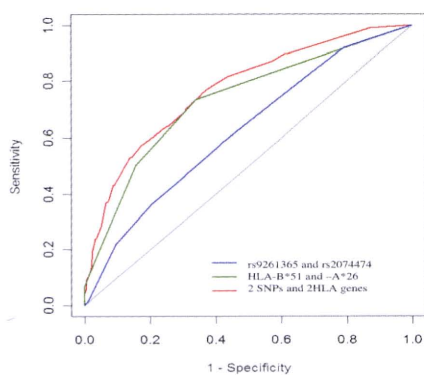


図3. 新規感受性2 SNPsはBD発症予測の効果を向上させる

表 1. 13 SNPsがHLA-B\*51, HLA-A\*26と独立してBDと関連する

SNP	Physical Position	Allele	Freq. in cases	Freq. in controls	Univariate			Multivariate		
					OR	95% CI	P-value	OR	95% CI	P-value
rs11752321	29969153	C	95.9	91.1	2.30	1.48-3.57	2.1x10 <sup>-4</sup>	2.1	1.30-3.38	2.3x10 <sup>-3</sup>
rs9261365	29994509	A	19.6	11.5	1.97	1.46-2.65	8.6x10 <sup>-6</sup>	2.05	1.48-2.83	1.3x10 <sup>-5</sup>
rs2074476	30074685	T	27.4	18.1	1.75	1.36-2.26	1.3x10 <sup>-5</sup>	1.85	1.40-2.45	1.5x10 <sup>-5</sup>
rs10947061	30143450	G	11.9	6.0	2.15	1.48-3.14	6.7x10 <sup>-5</sup>	1.85	1.22-2.80	4.0x10 <sup>-3</sup>
rs962899	30215954	G	65.7	55.8	1.55	1.25-1.92	6.2x10 <sup>-5</sup>	1.56	1.23-1.98	2.1x10 <sup>-4</sup>
rs2516713	30216389	T	66.3	54.1	1.71	1.38-2.11	1.1x10 <sup>-6</sup>	1.84	1.45-2.34	5.4x10 <sup>-7</sup>
rs2428507	30218449	T	71.8	63.0	1.51	1.21-1.88	2.3x10 <sup>-4</sup>	1.65	1.29-2.11	6.6x10 <sup>-5</sup>
rs2023478	30218600	C	66.0	54.5	1.66	1.34-2.05	4.1x10 <sup>-6</sup>	1.69	1.33-2.14	1.4x10 <sup>-5</sup>
rs2516700	30220214	C	66.4	53.9	1.72	1.39-2.14	6.9x10 <sup>-7</sup>	1.88	1.48-2.39	2.7x10 <sup>-7</sup>
rs1264619	30249152	G	73.9	65.5	1.50	1.20-1.88	3.8x10 <sup>-4</sup>	1.65	1.28-2.13	9.4x10 <sup>-5</sup>
rs3778624	30291720	C	69.0	58.6	1.52	1.24-1.86	6.1x10 <sup>-5</sup>	1.56	1.24-1.95	1.3x10 <sup>-4</sup>
rs2074474	30298628	T	65.9	54.0	1.68	1.36-2.09	1.9x10 <sup>-6</sup>	1.82	1.43-2.31	8.8x10 <sup>-7</sup>
rs974963	30303687	G	66.5	54.1	1.73	1.39-2.14	6.4x10 <sup>-7</sup>	1.88	1.48-2.39	2.4x10 <sup>-7</sup>

表 2. ステップワイズロジスティック回帰分析

	DF	P	OR	95%CI
HLA-A*26	1	3.0x10 <sup>-5</sup>	2.06	1.47-2.89
HLA-B*51	1	7.0x10 <sup>-23</sup>	5.84	4.11-8.30
rs9261365	1	5.2x10 <sup>-4</sup>	1.83	1.30-2.56
rs2074474	1	1.2x10 <sup>-4</sup>	1.64	1.27-2.08

表 3. ハプロタイプ解析

Haplotype	rs9261365	rs2074474	Frequency (%)	OR	95%CI	P-value
H1	G	C	37.8	Reference	-	-
H2	A	C	2.1	1.58	0.77-3.22	0.21
H3	G	T	46.6	1.53	1.23-1.91	1.6x10 <sup>-4</sup>
H4	A	T	13.5	2.5	1.80-3.47	4.5x10 <sup>-8</sup>

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

ベーチェット病に関する調査研究

ベーチェット病疾患感受性候補遺伝子ROBO1のリ・シーケンシング解析

研究分担者 太田正穂 信州大学医学部法医学教室

研究協力者 勝山善彦 信州大学付属病院薬剤部

目黒 明、水木信久 横浜市立大学大学院視覚器病態学

大野重昭 北海道大学医学部視覚器病学

椎名 隆、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

全ゲノムレベルにおけるマイクロサテライトを用いたベーチェット病（BD）疾患感受性遺伝子検索では、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に有意な相関が見られた。このマーカーはROBO1遺伝子のイントロン3内に存在していたことから、疾患感受性候補遺伝子としてROBO1遺伝子を推定した。遺伝子内に14種類のSNPを設定して、更に詳細な相関解析を行った。個々のSNPにおけるアリル頻度を基にハプロブロックを作成すると、患者群と健常者群間で、2個のSNPs（rs6779556-rs7653782）からなるハプロタイプに構造的な違いが観察され、そのハプロタイプ頻度に有意な相関（ $R.R.>6.7$ ,  $p<1.6\times 10^{-6}$ ）が認められた。有意差を示したハプロタイプ（T-C, G-T）は、患者群と健常者群においてマイナーな頻度を示すハプロタイプであったが、患者群においては何れも18%以上の頻度で存在していた。患者群と健常者群からこれらのハプロタイプを持ったサンプルを選び次世代シーケンサーを用いて、この遺伝子領域（950Kb）を現在解析中である。マイクロサテライトで検出されたアリルは時代的に新しく形成されたものと考えられ、このアリルがROBO1遺伝子内のSNPで見いだされた稀なハプロタイプと関連していると推測される。顕著な感受性を示したハプロタイプをもつ患者群は、ROBO1遺伝子の機能的性質から特殊な病態を示す群である可能性が高いと考えられる。

A. 研究目的

ゲノム全領域を網羅するマイクロサテライトマーカー23,465個を用いた疾患感受性遺伝子スクリーニングで、ベーチェットと相関を示すマイクロサテライトD3S0186iを検出した。このマイクロサテライトはROBO1（Roundabout）遺伝子のイントロン3に位置していたことから、ROBO1遺伝子を疾患感受性遺伝子と考えて詳細なマッピングを14種

類のSNPsを用いて相関解析を行った。その結果、2種類のSNPs間のハプロタイプで顕著な相関を示した（ $R.R.>6.7$ ,  $p<1.6\times 10^{-6}$ ）。一方我々が行った500K SNPsを用いたGWAS解析では、IL23R/IL12RB2とIL10遺伝子がベーチェット病の疾患感受性遺伝子として関与していることを報告した<sup>1)</sup>。GWAS解析ではROBO1遺伝子が上位30位内の候補遺伝子にも選出されていなかった。