

そこで今回、マイクロサテライト解析における結果とGWAS解析における結果の相違が生じる要因について考察するとともに、顕著な相関を示したハプロタイプをもつ患者群とコントロール群のROBO1遺伝子領域のリシークエンスを行い、遺伝子内の構造的な相違を比較し、疾患発症に関わる要因を考察する。

## 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で管理しているベーチェット病患者200人、健常者190人のDNAを解析に用いた。解析にあたり、使用するDNAは、提供者から同意を得たものを使用している。

② 解析に用いたROBO1遺伝子内SNPsと型判定

解析に用いたSNPsは、ROBO1遺伝子内約950Kb間に一定の間隔で設定したものである。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。

③ 統計解析は、 $\chi^2$  test, Fisher's exact test, Hardy Weinberg Equilibrium test, Linkage Disequilibrium (LD) analysis, Haplotype analysis (Haploview ソフト)を行った。

④ リシークエンス用のサンプル

リシークエンスは、Roche 454 FLXジュニア次世代シーケンサーを用いて解析する。解析はSNP2 (rs7653782) がT/Tのホモ接合体SNP3 (rs6795556) がC/Cのホモ接合体と、SNP2がG/Gのホモ接合体SNP3がT/Tのホモ接合体を示すサンプルを患者群と健常者群より選出した。

(倫理面への配慮)

全ての血液提供者に対して研究の目的、研究の期間と方法等、研究に関わる事項を十分説明して、インフォームドコンセントを得た上で参加して頂いた。得られた個人情報には連結匿名化の上、本研究に関わらない個人情報は管理者により厳重に管理されている。また、研究にあたっては、信州大学、横浜市立大学、北海道大学の各倫理委員会で承認を受けている。

## C. 研究結果と考察

日本人ベーチェット病患者においてROBO1遺伝子内に設けた14種類のSNPsを用いた相関解析では、rs7653782と弱い抵抗性の相関(R.R.=0.45, p=0.01)を示した。また、LDブロック構造を患者群と対照群で比較すると、SNP2 (rs7653782) -SNP3 (rs6795556) 間のLD値が両群で著しく異なっていた(表1)。この2つのSNPsの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。

SNP2とSNP3間においてTC,GTを示すハプロタイプを構成する総ての遺伝子型の実測数を求めると、表2に示すように何れの組合せにおいても患者群の方が、コントロール群に比べて有意に頻度が高かった。これらの情報を基に、SNP2, SNP3からハプロタイプTC, GTを示し、14種類の各SNPが極力ホモ接合体を示すサンプルを患者群で5サンプル、コントロール群で5サンプルを選んだ(表3)。これらのサンプルについて、現在Roche 454 FLXジュニア次世代シーケンサーを用いて解析中である。

通常GWASで疾患感受性として検出されるcommon variantは、疾患への効果が小さく、病気への影響度は大きくないと言われて

いる。今回ゲノムワイドなマイクロサテライト相関解析で見いだされたROBO1遺伝子は、遺伝子内にある2種類のSNPで示す稀なハプロタイプ内と関連があると考えられた。特にこの20Kb程の間に疾患感受性に関わる構造的な相違があると推定される。まれなアレルの病気への浸透度は中から高程度を示すといわれており、今回顕著な有意差を示した患者群は、ベーチェット病でも特殊な病態を示す可能性が考えられる。また、マイクロサテライトで検出されたアレルは時代的に新しく形成されたものと考えられ、このアレルが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たと推測される。

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と言われている<sup>2)</sup>。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。最近、網膜色素上皮細胞上のROBO1分子の発現量と増殖性硝子体網膜症との関係に関する報告もあり<sup>3)</sup>、ROBO1分子が眼組織で重要な機能を果たしていると推測され、本遺伝子がベーチェット病発症機序に関与している可能性が示唆される。

#### D. 参考文献

- 1) Mizuki N, Meguro A, Ota M, et al. Genome-wide association studies identify IL23R-IL12RB2 and IL10 as Behçet's disease susceptibility loci. *Nat Genet* 21 : 298-303, 2010.
- 2) 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.
- 3) Huang L, Xu Y, Yu W, et al. Effect of Robo1 on retinal pigment epithelial cells and experimental proliferative vitreoretinopathy. *Inv Ophth Vis Sci* 51: 3193-3204, 2010.

#### E. 健康危険情報

特記事項なし

#### F. 論文発表

1. 太田正穂、水木信久：「遺伝性疾患」と白内障。眼科ケア、12:92-95, 2010
2. 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.
3. 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. *Nat Genet*, 2010; 21:298-303.
4. 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: 1331-8.

5. 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.

G. 知的財産権の出願・特許状況

なし

表 1. SNP2-SNP3ハプロタイプとの相関

| SNP 2-3 Haplotype | Patient n=200 (%) | Contol n=191 (%) | R.R. | P                        |
|-------------------|-------------------|------------------|------|--------------------------|
| GC                | 96 (48.1)         | 123 (64.6)       | 0.51 | 0.0011                   |
| TT                | 29 (14.4)         | 58 (30.3)        | 0.39 | 0.00016                  |
| TC                | 38 (18.9)         | 6 (3.2)          | 6.76 | 1.6 x 10 <sup>-6</sup> * |
| GT                | 37 (18.6)         | 4 (1.9)          | 9.58 | 2.9 x 10 <sup>-7</sup> * |

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

\* : Yeatsの補正值

2 x 4 分画χ<sup>2</sup>検定: p=1.09 x 10<sup>-12</sup>

表 2. SNP2-SNP3における遺伝子型観測値

| SNP2-3 | SNP2     | SNP3      | Patient | Control | P 値     |
|--------|----------|-----------|---------|---------|---------|
|        | rs679556 | rs7653782 | n=200   | n=191   |         |
| T-C    | T/T      | C/C       | 9       | 0       | 0.003   |
|        | T/T      | C/T       | 13      | 4       | 0.033   |
|        | G/T      | C/C       | 31      | 8       | 0.0002  |
| G-T    | G/G      | T/T       | 11      | 0       | 0.001   |
|        | G/G      | C/T       | 30      | 5       | 0.00002 |
|        | G/T      | T/T       | 10      | 1       | 0.008   |

表 3. 解析に用いた資料の各SNPの遺伝子型

患者群

|        | SNP1      | SNP2      | SNP3      | SNP4     | SNP5    | SNP6     | SNP7     | SNP8      | SNP9      | SNP10     | SNP11     | SNP12     | SNP13     | SNP14     |
|--------|-----------|-----------|-----------|----------|---------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Sample | rs1328143 | rs6795558 | rs7653782 | rs333472 | rs31147 | rs328047 | rs328048 | rs6548801 | rs1701680 | rs9858034 | rs6788328 | rs1704825 | rs4533809 | rs7623728 |
| B1     | G/G       | T/T       | C/C       | T/T      | T/T     | A/A      | G/G      | A/A       | A/A       | G/G       | A/A       | T/T       | C/C       | T/T       |
| B2     | G/T       | T/T       | C/C       | C/C      | G/T     | A/A      | C/G      | A/A       | A/A       | G/G       | A/A       | T/T       | C/C       | C/C       |
| B3     | G/G       | T/T       | C/C       | C/C      | G/G     | A/A      | C/C      | A/A       | A/A       | G/G       | A/G       | C/T       | C/C       | C/T       |
| B4     | G/T       | G/G       | T/T       | T/T      | T/T     | G/G      | C/C      | A/G       | A/A       | G/G       | A/G       | C/T       | C/C       | T/T       |
| B5     | T/T       | G/G       | T/T       | T/T      | T/T     | G/G      | C/C      | G/G       | A/G       | A/G       | A/G       | C/T       | C/C       | C/T       |

健常者群

|        | SNP1      | SNP2      | SNP3      | SNP4     | SNP5    | SNP6     | SNP7     | SNP8      | SNP9      | SNP10     | SNP11     | SNP12     | SNP13     | SNP14     |
|--------|-----------|-----------|-----------|----------|---------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Sample | rs1328143 | rs6795558 | rs7653782 | rs333472 | rs31147 | rs328047 | rs328048 | rs6548801 | rs1701680 | rs9858034 | rs6788328 | rs1704825 | rs4533809 | rs7623728 |
| C1     | T/T       | T/T       | G/T       | C/C      | G/G     | A/A      | C/C      | A/A       | G/G       | A/G       | A/G       | C/C       | C/T       | T/T       |
| C2     | G/T       | T/T       | G/T       | T/T      | T/T     | G/G      | C/C      | A/G       | A/A       | A/A       | A/A       | C/T       | C/C       | C/T       |
| C3     | G/T       | T/T       | G/T       | T/T      | T/T     | A/G      | C/G      | A/A       | G/G       | G/G       | A/G       | C/T       | C/C       | C/T       |
| C4     | T/T       | G/G       | G/T       | T/T      | G/G     | A/G      | C/G      | A/G       | A/A       | G/G       | G/G       | C/T       | C/C       | C/T       |
| C5     | G/T       | G/G       | G/T       | T/T      | T/T     | A/A      | G/G      | A/A       | A/A       | A/G       | A/A       | T/T       | C/C       | G/T       |

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

韓国人ベーチェット病患者におけるマイクロサテライト解析とHLA-A\*26の検討

研究分担者 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  
研究協力者 堀江 幸弘 北海道大学大学院医学研究科眼科学分野  
          北市 伸義 北海道医療大学眼科学分野  
          目黒 明 横浜市立大学大学院医学研究科視覚器病態学  
Eun Bong Lee Department of Internal Medicine and Graduate Program in  
Immunology, National Research Laboratory of Rheumatic Diseases, Seoul National  
University Hospital, Seoul, Korea  
Yeong-Wook Song Department of Internal Medicine and Graduate Program in  
Immunology, National Research Laboratory of Rheumatic Diseases, Seoul National  
University Hospital, Seoul, Korea  
Kyung Sook Park Department of Biology, College of Natural Sciences, Sungshin  
Women's University, Seoul, Korea  
南場 研一 北海道大学大学院医学研究科眼科学分野  
石田 晋 北海道大学大学院医学研究科眼科学分野  
太田 正穂 信州大学医学部法医学  
猪子 英俊 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学  
水木 信久 横浜市立大学大学院医学研究科視覚器病態学

研究要旨

近年日本人ベーチェット病患者において23,465個のマイクロサテライトマーカーを用いたゲノムワイド関連解析の結果が報告され、6つのマーカーがベーチェット病と関連すること、そしてHLA-A\*26が新しい疾患関連遺伝子であることが明らかになった [Ann Rheum Dis. 2010; 69: 747]。そこで今回は他民族での再現性を検討するため韓国人ベーチェット病における遺伝子解析を行った。

韓国のソウル国立医科大学内科でベーチェット病と診断されたベーチェット病患者119例、健常対照韓国人141例を対象とし、6つのマイクロサテライトマーカーにおけるfragment解析とHLA-A, -Bタイピングを行いその頻度を比較検討した。

その結果6つのマイクロサテライトマーカーのうちHLA-B遺伝子付近に存在するD6S0032iのみが有意差を示した (P=0.028)。HLA-A\*26、-B\*51の表現型頻度がそれぞれ患者群で有意に多くみられた (-A\*26 : P=0.040、-B\*51 : P=0.00064)。

結論として既知のHLA-B\*51に加えHLA-A\*26が韓国人ベーチェット病でも疾患関連遺伝子であることが明らかになった。

## A. 研究目的

横浜市大眼科水木教授のグループが日本人ベーチェット病 (BD) 検体を用いたマイクロサテライトゲノムワイドの研究から6つのマイクロサテライトマーカーがBDの疾患に関連していること、そしてHLA-A\*26が新しい疾患感受性遺伝子の一つであると報告した (Ann Rheum Dis 2010;69:747)。我々は他の民族である韓国人BD検体を用いてこれらの結果の再現性を検討した。

## B. 研究方法

### [対象]

韓国ソウル国立医科大学内科でBDと診断された119例 (男性61例、女性58例) と健常対照者141例の合計260検体である。

### [方法]

末梢血から抽出したDNAを用いて、日本人で関連が指摘された6つのマイクロサテライトマーカー (D3S0186i, D6S0014i, D6S0032i, 536G12A, D12S0645i, D22S0104i) のPCRをおこないfragment解析を行った。HLA-A,Bタイピングをダイレクトシーケンス法にて行った。

### (倫理面への配慮)

本病患者および健常対照者一人一人に対し、本研究の主旨を説明し、遺伝子解析を行なうことに対する同意を得た上で採血を行った。

## C. 研究結果

韓国人ベーチェット病患者の臨床像は、口腔内アフタ性潰瘍が119例全例に見られ、陰部潰瘍が92例 (77.3%)、結節性紅斑などの皮膚症状96例 (80.7%)、眼症状45例 (37.8%)、深部血栓20例 (16.8%)、関節炎が57例 (47.9%) にみられた。

6つのマイクロサテライトマーカーのfragment解析の結果HLA-B遺伝子近傍に存在する1つのマーカー (D6S0032i) のみ有意差がみられた ( $P=0.028$ )。HLA-A,-B遺伝子タイピングの結果、患者群の遺伝子頻度はHLA-A\*26が8.5%、-B\*51が23.1%であり、健常対照群の4.3%、11.2%に比較し有意に上昇していた (-A\*26:  $P=0.047$ ,  $OR=2.08$ ,  $CI=1.00-9.73$ 、-B\*51:  $P=0.00028$ ,  $OR=2.39$ ,  $CI=1.48-9.23$ )。また患者群の表現型頻度もHLA-A\*26が16.0%、-B\*51が39.5%であり、健常対照群の7.9%、20.1%に比較し有意に上昇していた (-A\*26:  $P=0.040$ ,  $OR=2.27$ ,  $CI=1.02-10.28$ 、-B\*51:  $P=0.00064$ ,  $OR=2.59$ ,  $CI=1.49-9.74$ )。

## D. 考察

23,465個のマイクロサテライトマーカーを用いた日本人BDにおける結果、6つのマイクロサテライトマーカーが疾患に関連していた。韓国人では6つのうちHLA-B遺伝子近傍に存在するマーカー1つのみ関連が得られた。この結果の違いに関しては更なる文献検索、データ解析が必要と考えられるが、その理由の一つに民族の相違による結果の相違ということがあげられる。これまでBDに限らずさまざまな疾患において新しい疾患感受性遺伝子の発見があっても他民族・他人種で再現性が確認されないことがしばしばみられていたからである。今回の結果もそういったことが関係しているのかもしれない。

次にHLA-A\*26に関してB\*51に比較すると弱い関連であるがやはり日本人同様韓国人でもその関連を再確認することができた。HLA-A遺伝子とBDの研究はこれまでアイルランド人、サウジアラビア人、イスラエル人、パレスチナ・ヨルダン人、トルコ人、日本人、そしてギリシャ人で行われており、トルコ人、

日本人、ギリシャ人ではA\*26が患者で有意に多くみられている。他民族のHLA-Aの結果に関してはHLA-B\*51の影響を除いたうえで再解析を行うか、あるいは検体数を増やすなど更なる検討が必要であると考えた。

またHLA-A\*26とB\*51両方陽性の患者は7例おり健常人に比較し有意におおくみられた(P=0.032)。しかしその臨床症状はその他のBD患者群と比較しても有意な違いはみられなかった。

以上からHLA-A遺伝子はBDに関与していることが最近明らかになっており、今後注目すべき遺伝子のひとつであると考えられる。

## E. 結論

既知のHLA-B\*51に加えHLA-A\*26が韓国人ベーチェット病でも疾患関連遺伝子であることが明らかになった。

## F. 健康危険情報

特記事項なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Yukihiro Horie, Wataru Saito, Nobuyoshi Kitaichi, Toshie Miura, Susumu Ishida and Shigeaki Ohno. Evaluation of NLRP1 gene polymorphisms in Vogt-Koyanagi-Harada disease. Jpn J Ophthalmol. In press.
2. Nobuhisa Mizuki, Akira Meguro, Masao Ota, Shigeaki Ohno, Tomoko Shiota, Tatsukata Kawagoe, Norihiko Ito, Jiro Kera, Eiichi Okada, Keisuke Yatsu, Yeong-Wook Song, Eun-Bong Lee, Nobuyoshi Kitaichi, Kenichi Namba, Yukihiro Horie, Mitsuhiro Takeno, Sunao Sugita, Manabu Mochizuki, Seiamak Bahram, Yoshiaki

Ishigatsubo and Hidetoshi Inoko. Genome-wide association studies identify IL23R-IL12RB2 and IL10 as Behçet's disease susceptibility loci. Nat Genet 2010; 42, 703.

## 2. 学会発表

1. Yukihiro Horie, Akira Meguro, Nobuyoshi Kitaichi, Masao Ota, Kenichi Namba, Yeong Wook Song, Kyung Sook Park, Eun Bong Lee, Hidetoshi Inoko, Nobuhisa Mizuki, Susumu Ishida and Shigeaki Ohno. Association of TLR4 polymorphisms with Behçet's disease in Japanese and Korean populations. 14th conference of the ISBD 第14回 国際ベーチェット病学会.ロンドン, 英国. 2010.7/7-7/10

## H. 知的財産権の出願、登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## 厚生労働科学研究費補助金

### ベーチェット病の補助診断としての自家唾液反応の有用性の評価

研究分担者 中村晃一郎 埼玉医科大学皮膚科

研究協力者 金子 史男 南東北総合病院アレルギー免疫研究所

#### 研究要旨

ベーチェット病（B病）の症状は口腔内アフタ性潰瘍から始まることが多く、典型例では診断が容易であるが、非典型例では診断に苦慮する症例がある。B病の患者の口腔内細菌叢では*S. sanguinis*を含むレンサ球菌群が多く、これらに対する遅延型反応を示すことが明らかにされている。自家唾液に含まれる*S. sanguinis*に対する過敏反応を検出する目的で、自家唾液に対するプリック反応の有用性を検討した。その結果、B病で強反応を示す症例が認められた。自家唾液をフィルターで除去するとその反応の減弱を示す症例が存在した。細菌培養では自家唾液中に*S. sanguinis*が存在し、フィルター下でその存在が除去された。これらの結果は自家唾液反応が*S. sanguinis*に対する反応であることを示唆しており、また本テストがB病診断の簡便法としての診断の参考になる可能性を示している。

#### A. 研究目的

ベーチェット病（B病）は、口腔内アフタ、陰部潰瘍、眼症状に、皮膚症状（結節性紅斑、毛嚢炎、針反応陽性）を呈する多臓器難治性疾患である。本症の発症機序は不明であるが、病態として、HLA-B51、HLA-A26をはじめとする遺伝背景、さらに環境因子として口腔内常在菌としての*Streptococcus sanguinis* (*S. sanguinis*)をはじめとするレンサ球菌の関与が報告されている。これまでB患者にレンサ球菌を用いた皮内テストを施行すると紅斑、膿疱を生じることを明らかにしてきた。すなわち常在菌であるレンサ球菌に対する過敏反応がB病の発症・増悪に関与する可能性が強く示唆される。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ことが考えられる。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

るかをこれまでの研究で解析した。

#### B. 研究方法

自家唾液によるレンサ球菌の確認を培養で行った。次にB病（神経B病、不全型、完全型を含む）、および再発性口内炎、結節性紅斑、健常人で自家唾液反応（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。研究はヘルシンキ宣言を遵守して施行した。

#### C. 研究結果

MS培地（*S. mitis* and *S. salivarius* agar）を用いてB病患者の自家唾液を培養した。培養3日後、5日後にレンサ球菌（*S. Sanguinis*）の増殖を認めた。自家唾液をミリポアフィルター（0.2  $\mu$ m filter）を通過させてMS培地で培養するとレンサ球菌コロニーが生じないことを確認した。（図1）

つぎにB病患者（10名）で自家唾液を用い

たプリック反応を施行した。5名で直径10mm以上の紅斑および穿刺部位での小膿疱を認めた。通常の結節性紅斑、再発性口内炎では、7名中2名で直径8mmの紅斑を認めた。健常人では紅斑を認めなかった。またB病における紅斑は、自家唾液をあらかじめミリポアフィルターで処理することで、自家唾液反応で陽性反応を示したB病中3名が小さな点状反応を示した(図2)。

#### D. 結論

B病の自家唾液には、磯貝らの報告で示されるように、レンサ球菌 (*S. sanguinis*) が多く存在することが確認された。さらにB病に含まれる*S. Sanguinis*を用いた自家唾液プリック反応を試みたところ、B病で強い自家唾液反応を示した症例が存在した。すなわち自家唾液中にレンサ球菌 (*S. Sanguinis*) が含まれており、レンサ球菌に対する過敏反応を生じる機序が推定された。また自家唾液中のレンサ球菌をミリポアフィルターで除去すると反応が減弱した。これらの結果は、自家唾液プリック反応がレンサ球菌に対するプリック反応の診断の簡便性として利用できる可能性を示していると考えられた。

#### 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
4. 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、富樫亜史、尾山徳孝、中村晃一郎。ベーチェット病の補助診断としての自家唾液反応によるプリック反応。日本皮膚学会雑誌。120(9): 1901-1905, 2010.
3. 金子史男、富樫亜史、斎藤早苗、尾山徳孝、中村晃一郎。ベーチェット病の病態、2010。Biotherapy.2010(4)、191-198、2010.
4. Kaneko F, Togashi A, Saito S, Sakuma H, Oyama N, Nakamura K, Yokota K, Oguma K. Behcet disease(Adamantiades-Behcet disease). *Clinical and Developmental Immunology*. 2010. in press.

##### 2. 学会発表

1. Nakamura K, Kanko F. Prick test with



self-saliva as an auxiliary diagnostic measure in Behcet's disease. 14<sup>th</sup> International Conference on Behcet's Disease. London. July 8th, 2010.

2. Nakamura K, Kanko F. The role of streptococcus antigen in Behcet's disease. Korea-Japan Joint Symposium of Behcet's disease. (Korean Society for Behcet's Disease). Seoul. November 13th, 2009.

## H. 知的財産権の出願、登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし



図1. 自己唾液におけるStreptococcusの増殖の比較 (ミリポアフィルター前処理との比較)

| Patients             | S-prick<br>(after 48 h) | small pustule | SS-prick | CS-prick |
|----------------------|-------------------------|---------------|----------|----------|
| Neuro BD 55 M        | 11x15mm                 | +             | nd       | -        |
| Incomplete 33 F      | 22 x 22                 | -             | -        | -        |
| 26 F                 | 10x10                   | +             | + dot    | -        |
| 27 M                 | 11x 12                  | +             | + dot    | -        |
| 47 M                 | 10x 13                  | +             | + dot    | -        |
| 36 F                 | 5x10                    | -             | nd       | -        |
| 46 M                 | 10x10                   | -             | -        | -        |
| 17 F                 | 5x5                     | -             | -        | -        |
| 34 F                 | 6x 14                   | -             | -        | -        |
| Complete 23 M        | 10x 10                  | +             | -        | -        |
| Recurrent aphthosis  |                         |               |          |          |
| 24 F                 | 8x10mm                  | -             | -        | -        |
| 28 F                 | 8x4                     | -             | -        | -        |
| 32 F                 | -                       | -             | nd       | -        |
| 29 M                 | -                       | -             | nd       | -        |
| 28 F                 | 3x5                     | -             | -        | -        |
| Disease controls     |                         |               |          |          |
| non BD EN 39 F       | -                       | -             | nd       | -        |
| 61 F                 | -                       | -             | -        | -        |
| viral aphthosis (3)  | -                       | -             | nd       | -        |
| Healthy controls (6) | -                       | -             | -        | -        |

図2. Prick tests in patients with aphthous ulceration and controls

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

ベーチェット病とインフラマソームに関する研究

研究代表者 石ヶ坪良明 横浜市立大学免疫病態制御内科学  
研究協力者 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

自己炎症性症候群の代表疾患である家族性地中海熱は好発地域がトルコであることやコルヒチンが有効といった点でベーチェット病と共通点がある。また同疾患の原因遺伝子であるMEFV遺伝子の変異はベーチェット病の感受性遺伝子である可能性が示唆されている。

本研究ではMEFV遺伝子産物であるpyrinがベーチェット病の病態に影響し、さらにコルヒチンの作用点になっていると考え、pyrinの機能解析を進めた。また同時にベーチェット病患者におけるMEFV遺伝子の変異保有率を調べた。Pyrinの機能解析の結果、pyrinと結合する新規タンパクとして $\beta$ 2microglobulinを同定した。また $\beta$ 2microglobulinは家族性地中海熱患者で変異を認めるpyrinのB30.2領域に結合していることが明らかになった。

またNIHと共同で日本人・トルコ人のベーチェット病患者についてMEFV遺伝子変異を調べたところトルコ人においてMEFV遺伝子の変異M694Vはベーチェット病罹患のリスクになることが明らかになった。

A. 研究目的

自己炎症性症候群はインフラマソームの機能異常により発症し、臨床症状に口腔内アフタ・ぶどう膜炎・陰部潰瘍・針反応陽性などを呈することからベーチェット病の類縁疾患とする説もある。中でも自己炎症性症候群の代表疾患である家族性地中海熱はトルコを中心とする地中海地方に好発し、コルヒチンが有効であることから特にベーチェット病と関連性が推測されている。

家族性地中海熱は16番染色体にあるMEFV

遺伝子の変異によって発症する常染色体劣性遺伝疾患であり、このMEFV遺伝子の変異はベーチェット病患者、中でも血管病変を有する患者に保有率が高いとする報告がある。

以上のことから我々はMEFV遺伝子産物であるpyrinがベーチェット病の病態に関与していると考えており、pyrinの機能解析を行うことでベーチェット病の病因およびコルヒチンの作用機序解明を目的としている。

## B. 研究方法

### 1. Pypinの機能解析

Pypinの機能解析として結合タンパクのスクリーニングをyeast two hybrid法および免疫沈降法により行った。

Yeast two hybrid法では酵母はAH109株を用い、転写因子はGAL4を利用した。baitには全長のpypinとB30.2領域のみのpypinをそれぞれ用い、preyにはヒト白血球cDNA ライブラリーを用いた。baitプラスミドとpreyプラスミドの両者を形質転換した酵母のうち、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クローンを陽性クローンとした。全長pypin、B30.2 pypinの両者のbaitで陽性でタンパクについて免疫沈降法でpypinとの結合を確認した。

免疫沈降法はC末端にflagタグを付したpypin、C末端にT7タグを付したスクリーニングタンパクをchinese hamster ovary細胞にFuGeneHDを用いてlipofectionを行い24時間後に免疫沈降によりタンパク結合を確認した。Pypinとの結合領域決定には全長pypin、exon2~10、exon3~10、exon4~10、exon10、exon1~9のそれぞれのpypinを用いて上記と同様にして免疫沈降法で結合部位を同定した。

### 2. MEFV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た。

### 3. ベーチェット病感受性copy number variationの検索

上記実験で用いたDNA検体の中からトルコ人ベーチェット病患者検体を用いてcopy number variationのホモ欠損を認める遺伝子を検索した。その結果得られた各遺伝子についてトルコ健常人のcopy numberと比較し、両者のホモ欠損率に有意差を認めるcopy number variation領域を検索した。さらにトルコ人検体で有意差を認めたcopy number variation領域について日本人、韓国人、ギリシア人に関しても保有率の差を検討した。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析については当施設の倫理委員会の承認の元行い、検体の収集に当たっては被験者に研究内容について十分な説明を行った上で書面による同意を得ている。検体の管理に関しては検体台帳を非連結・施錠下で保管し、被験者の匿名性を確保している。

## C. 研究結果

### 1. Pypinの機能解析

上記手法によりyeast two hybridによる結合タンパクスクリーニングの結果、全長pypin、B30.2 pypinに共通して結合するタンパクを9種類同定した (表1参照)。これら9種類のタンパクについて免疫沈降法によりタンパク結合を確認したところ $\beta$ 2microglobulinの結合を確認した。さらに $\beta$ 2microglobulinのpypin結合部位を免疫沈降法によって検索した結果、家族性地中海熱で変異を認めるB30.2領域での結合を確認することができた (図1参照)。

### 2. MEFV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したが、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2参照)

### 3. ベーチェット病感受性copy number variationの検索

トルコ人ベーチェット病患者検体でホモ欠失領域を218ヶ所同定した。それぞれについて健常トルコ人と保有率を比較した、2領域について有意差を認めた。さらに日本人・韓国人・ギリシャ人検体を用いて同領域のcopy number variationを調べたところLEPREL1 intron1について有意差を認めた(表3参照)

#### D. 考察

今回我々はpyrinのB30.2領域に結合するタンパクとして $\beta$ 2microglobulinを同定した。また同時にトルコ人患者においてMEFV遺伝子のpyrin B30.2領域の変異がベーチェット病罹患のリスクであることも確認することができた。これらのことからpyrinはベーチェット病の発症・病態に関与している可能性が高い。このpyrinと $\beta$ 2microglobulinの結合が家族性地中海熱およびベーチェット病にどのように関与しているかは現時点では不明である。しかしながらベーチェット病のリスクとしてHLA-B51やHLA-A26の保有は以前より報告されており、 $\beta$ 2microglobulinはMHCクラスI分子と結合することから今後の結果によってはHLAの表現型とベーチェット病の発病の関連が説明できる可能性がある。また $\beta$ 2microglobulinは好中球の顆粒内にも認められ、この $\beta$ 2microglobulinの機能は不明であり、pyrinが顆粒内の $\beta$ 2microglobulinの機能に関与している可能性もある。そしてコルヒチンは炎症性疾患の中でも痛風、家族性地中海熱、ベーチェット病といった限られた疾患に対してしか有効性が確立していないこと

からpyrin- $\beta$ 2microglobulin結合によるシグナル伝達の周辺にコルヒチンの作用点があるものと考えられる。

またcopy number variation解析ではLEPREL1 intron1領域のホモ欠損がベーチェット病に対して保護的に働いていることを示すことができた。これは多因子疾患であるベーチェット病の病因を解析していく上で、遺伝子の多型・変異のみでなくcopy number variationも考慮していく必要性があることを示している。

#### E. 結論

我々はpyrin B30.2領域と $\beta$ 2microglobulinの結合を証明し、トルコ人患者においてpyrin B30.2領域の変異がベーチェット病のリスクとなることを示した。しかしながらpyrinがベーチェット病の発症にどのように関与するかは明らかにすることができなかった。

トルコ人においてはMEFV遺伝子のM694V変異がベーチェット病のリスクとなることを示した。またトルコ人、日本人、韓国人、ギリシア人に関してはLEPREL1遺伝子intron1のホモ欠損率がベーチェット病患者に優位に低いことが明らかになった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Ideguchi H, Suda A, Takeno M, Kirino Y, Ihata A, Ueda A, Ohno S, Baba Y, Kuroiwa Y, Ishigatsubo Y. Neurological manifestations of Behçet's disease in Japan: a study of 54 patients. J Neurol. 2010 Jun.
2. Ideguchi.H, Suda. A, Takeno. M, Ueda. A, Ohno.S, Ishigatsubo. Y. Chronological manifestations in Japanese patients with Behçet's disease: Retrospective cohort study in two university hospitals.

Medicine in press.

3. Kirino Y, Takeno M, Watanabe R, Murakami S, Kobayashi M, Ideguchi H, Ihata A, Ohno S, Ueda A, Mizuki N, Ishigatsubo Y. Association of reduced heme oxygenase-1 with excessive Toll-like receptor 4 expression in peripheral blood mononuclear cells in Behçet's disease. *Arthritis Res Ther.* 2008;10
4. 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. *Nat Genet.* 2010 Aug
5. Remmers EF, Cosan F, Kirino Y, Ombrello MJ, Abaci N, Satorius C, Le JM, Yang B, Korman BD, Cakiris A, Aglar O, Emrence Z, Azakli H, Ustek D, Tugal-Tutkun I, Akman-Demir G, Chen W, Amos CI, Dizon MB, Kose AA, Azizlerli G, Erer B, Brand OJ, Kaklamani VG, Kaklamani P, Ben-Chetrit E, Stanford M, Fortune F, Ghabra M, Ollier WE, Cho YH, Bang D, O'Shea J, Wallace GR, Gadina M, Kastner DL, Gül A. Genome-wide association study identifies variants in the MHC class I, IL10, and IL23R-IL12RB2 regions associated with Behçet's disease. *Nat Genet.* 2010 Aug
6. Takase K, Ohno S, Ideguchi H, Uchio E, Takeno M, Ishigatsubo Y. Successful switching to adalimumab in an infliximab-allergic patient with severe Behçet disease-related uveitis. *Rheumatol*

*Int.* 2009 Oct 9.

#### 国内雑誌

1. 石ヶ坪良明：【膠原病 新たな治療戦略】膠原病類縁疾患 ベーチェット病(解説/特集) 臨床と研究 87巻9号
2. 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 p82-83 2009
3. 石ヶ坪良明：Behcet病Up-To-Date 日本内科学会雑誌98巻3号 p583-588 2009
4. 岳野光洋, 石ヶ坪良明【関節リウマチ(第2版) 寛解を目指す治療の新時代】関節リウマチの類縁疾患とその鑑別診断 Behcet病(解説/特集) 日本臨床68巻増刊号5 p602-605 2010
5. 岳野光洋, 石ヶ坪良明【Emergency 実戦ガイド】疾患と対応 膠原病 Behcet病(特殊型、腸管型) 内科103巻6号 p1482-1487 2010
6. 岳野光洋, 石ヶ坪良明：【膠原病診療のブレイクスルー 早期診断・早期治療のポイント】膠原病の難治性病態の早期診断・早期治療のこつ 神経Behcet 内科101巻4号 Page728-731 2008

#### 2. 学会発表

##### 国際学会

1. Ishigatsubo Y. Clinical spectrum of Behçet's disease in Japan and evaluation of novel biomarkers in determination of disease subsets and response to therapy. Combined Conference on CRMO/SAPHO and Behçet's disease NIH/Bethesda, USA 2008 Sep.
2. Ishigatsubo Y Experience with anti-TNF Agents in Behçet's Disease. American College of Rheumatology 73rd ACR, Philadelphia, USA, 2009.Oct

3. Ishigatsubo Y. Genetics of Behcet's disease. Korean Japan Joint Symposium. Korean Japan Joint Symposium. Seoul, 2010.Nov
  4. Takeno M, Kirino Y, Watanabe R, Hama M, Samukawa S, Murakami S, Kobayashi M, Ueda A, Ishigatsubo Y. Excessive TLR4 expression is associated with reduced HO-1 expression in peripheral mononuclear cells from patients with Behçet's disease. 13th International Conference on Behçet's disease. Klagenfurt, Austria, 2008, May
  5. Suda A, Takeno M, Ideguchi H, Takase K, Hama M, Kirino Y, Ihata A, Ueda A, Ohno S, and Ishigatsubo Y. Neurological manifestations in Japanese patients with Behcet's disease: a retrospective analysis in Japan. 13th International Conference on Behçet's disease. Klagenfurt, Austria, 2008, May
  6. Suda A, Ideguchi H, Takeno M, Uehara T, Samukawa S, Harada S, Ihata A, Ohno S, Ueda A, Ishigatsubo Y. Neurological manifestations of Behcet's disease in Japan. 72<sup>nd</sup> American College of Rheumatology, San Francisco, USA, 2008, October
  7. Suda A, Ideguchi H, Takeno M, Ohno S and Ishigatsubo Y. Immunosuppressant Related Neurological Involvement in Behcet's Disease. 73<sup>rd</sup> American College of Rheumatology, Philadelphia, USA, 2009. Oct
  8. Suda A, Ideguchi H, Takeno M, Ono S, Ihata A, Ueda A and Ishigatsubo Y. MRI Imaging Findings in Neuro-Behcet Disease.73<sup>rd</sup> American College of Rheumatology, Philadelphia, USA, 2009. Oct
  9. 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. 73<sup>th</sup> American College of Rheumatology, Philadelphia, USA, 2009.Oct
- 国内学会
1. 石ヶ坪良明：ベーチェット病の病態と臨床に関する最近の話題 第54回 日本リウマチ学会学術総会、神戸、2009年4月
  2. 石ヶ坪良明：ベーチェット up-to-date. 平成20年度日本内科学会生涯教育講演会Aセッション2008年2月 大阪
  3. 石ヶ坪良明：ベーチェット up-to-date. 平成20年度日本内科学会生涯教育講演会Aセッション2008年5月 横浜
  4. 石ヶ坪良明：ベーチェット up-to-date. 平成20年度日本内科学会生涯教育講演会Aセッション2008年9月 愛媛
  5. 出口治子, 須田昭子, 岳野光洋, 高瀬 薫, 大野 滋, 桐野洋平, 井畑 淳, 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 日本リウマチ学会学術総会、東京、2009年4月
  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 7 第53回 日本リウマチ学会学術総会、東京、2009年4月
  7. 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 日本リウマチ学会学術総会、東京、2009年4月
8. 須田昭子, 出口治子, 上原武晃, 大村賢治, 井畑 淳, 上田敦久, 大野 滋, 岳野光洋, 石ヶ坪良明: 神経ベーチェット病・治療 神経ベーチェット病患者の頭部MRI画像所見の検討 第54回 日本リウマチ学会学術総会、神戸、2009年4月
  9. 須田昭子, 出口治子, 岳野光洋, 寒川 整, 浜 真麻, 桐野洋平, 井畑 淳, 大野 滋, 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(NBD)発症の危険因子の解析 第53回 日本リウマチ学会学術総会、東京、2009年4月
  10. 須田昭子, 出口治子, 岳野光洋, 上原武晃, 浜 真麻, 桐野洋平, 井畑 淳, 大野 滋, 上田敦久, 馬場泰久, 黒岩義之, 石ヶ坪良明. 当院における神経ベーチェット病(NBD)の検討. 第23回日本臨床リウマチ学会2008年11月
  11. 高瀬 薫, 出口治子, 大野 滋, 岳野光洋, 石ヶ坪良明 神経ベーチェット病・治療 InfliximabからAdalimumabのswitchingが奏効したベーチェット病関連難治性ぶどう膜炎 第54回 日本リウマチ学会学術総会、神戸、2009年4月
  12. 岳野光洋, 石ヶ坪良明 神経ベーチェット病・治療 腸管ベーチェット病に対するインフリキシマブ治療の実態 第54回 日本リウマチ学会学術総会、神戸、2009年4月
  13. 岳野光洋, 浜 真麻, 桐野洋平, 須田昭子, 井畑 淳, 上田敦久, 水木信久, 石ヶ坪良明. ベーチェット病(BD)に対するインフリキシマブ(IFX)治療と眼外症状. 第52回 日本リウマチ学会学術総会. 札幌、2008年4月

14. 岳野光洋. ベーチェット病診療ガイドライン作成に向けて 第17回IBD&ベーチェット病の検討会. 東京. 2008年6月
15. 岳野光洋. ベーチェット病. 自己免疫 vs 自己炎症. 関西腸疾患セミナー. 大阪. 2008年8月

#### 和文著書

1. 石ヶ坪良明: 今日の治療指針 ベーチェット病 746-748, 2011年度版
2. 石ヶ坪良明: 「下痢と腹痛および大量の下血を訴えて来院した29歳男性」、New 専門医を目指すケース・メソッド・アプローチ 膠原病・リウマチ橋本博史編、日本医事新報社2008,269-283

#### G. 知的財産権の出願、登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

表 1

| 陽性タンパク名   | 全長 | B30.2 |
|---|----|-------|
| ferritin, heavy polypeptide 1 (FTH1)                        | 5  | 1     |
| eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 (EEF1A1) | 14 | 1     |
| tumor protein, translationally-controlled 1 (TPT1)          | 2  | 1     |
| cytochrome c oxidase subunit Va (COX5A)                     | 1  | 1     |
| cytochrome b-245, alpha polypeptide (CYBA)                  | 1  | 2     |
| beta-2-microglobulin (B2M)                                  | 2  | 2     |
| Actin(ACTB)   | 3  | 1     |
| Flotillin1 (FLOT1)  | 2  | 1     |
| Lymphotoxin beta (LTB)                                      | 2  | 2     |

Pyrin/TRIM20 結合タンパクの検索  
結合部位の同定

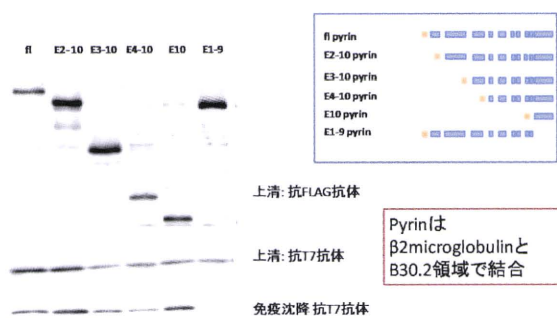


図 1

表 2. MEFV遺伝子解析結果

E148Q

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

M694V

| Series  | Diagnosis | Subject n | CC | CG  | GG   | MAF% | OR (95% CI)         | Pvalue               |
|---------|-----------|-----------|----|-----|------|------|---------------------|----------------------|
| Turkish | BD        | 1167      | 4  | 101 | 1062 | 4.7  | 2.72<br>(1.89-3.93) | 3.1x10 <sup>-3</sup> |
|         | Control   | 1274      | 0  | 43  | 1231 | 1.7  |                     |                      |

M694I ヘテロ  
日本人 BD n=2, HC n=1

表 3. LEPREL1 intron1 のホモ欠失保有率を  
ベーチェット病群と健常人で比較

| Series     | Method                    | Diagnosis | Subject n | Homo del n | %    | OR (95% CI)      | Pvalue               |
|------------|---------------------------|-----------|-----------|------------|------|------------------|----------------------|
| Turkish    | Illumina HumanCNV370 Chip | BD        | 1215      | 91         | 7.5  | 0.62 (0.47-0.82) | 6.5x10 <sup>-4</sup> |
|            |                           | Control   | 1278      | 147        | 11.5 |                  |                      |
| Japanese   | Q-PCR                     | BD        | 384       | 62         | 16.1 | 0.64 (0.45-0.90) | 0.012                |
|            |                           | Control   | 417       | 97         | 23.3 |                  |                      |
| Japanese 2 | Q-PCR                     | BD        | 72        | 8          | 11.1 | 0.63 (0.27-1.42) | 0.26                 |
|            |                           | Control   | 192       | 32         | 16.7 |                  |                      |
| Korean     | Q-PCR                     | BD        | 52        | 10         | 19.2 | 0.55 (0.21-1.41) | 0.21                 |
|            |                           | Control   | 43        | 13         | 30.2 |                  |                      |
| Greek      | Q-PCR                     | BD        | 98        | 6          | 5.8  | 0.76 (0.24-2.46) | 0.65                 |
|            |                           | Control   | 75        | 6          | 7.4  |                  |                      |
| Combined*  |                           | BD        | 1821      | 177        |      | 0.63 (0.51-0.77) | 2.9x10 <sup>-6</sup> |
|            |                           | Control   | 2005      | 295        |      |                  |                      |



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

Th17がベーチェット病の病変形成に関与している

研究分担者 桑名 正隆 慶應義塾大学医学部内科学教室  
研究協力者 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

ベーチェット病（BD）病変部にはリンパ球浸潤がみられ、病態への関与が指摘されている。そこで、IL-17を主に産生するTh17サブセットに着目し、BD病態への関与を検討した。対象はBD27例、健常人13例。mitogen刺激後のCD4<sup>+</sup>T細胞中のIL-17産生細胞の比率は健常人に比べてBDで高かった。IL-17産生が誘導されたCD4<sup>+</sup>T細胞の90%以上がケモカインレセプターCCR6陽性であったことから、末梢血中のCD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>T細胞の比率を活動期と非活動期で比較した。その結果、活動期ではCD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>T細胞の比率が低下していた。さらにCCR6のリガンドCCL20（MIP-3 $\alpha$ ）に対するCD4<sup>+</sup>T細胞の遊走能を検討したところ、健常人と比較してBDで高い遊走能を認めた。BD各病変の有無で層別化した2群間でTh17比率を比較すると、高いTh17比率と関連する病変として眼病変が抽出された。以上よりTh17がBDの病態に関わる可能性が示された。Th17は新たな治療ターゲットとなりうるかもしれない。

A. 研究目的

ベーチェット病（BD）は原因不明の炎症性疾患であり、病変部組織ではリンパ球の浸潤が認められる。これまで、BDではCD4<sup>+</sup>T細胞応答がTh1に偏位することが示されてきた。近年、CD4<sup>+</sup>T細胞にはTh1/Th2サブセット以外にIL-17産生を特徴とするTh17という新たなサブセットが存在すること報告された。また、最近の全ゲノム相関解析ではTh17分化に必要なIL-23受容体をコードするIL-23RB2遺伝子が疾患感受性遺伝子の一つとして同定され、BD病態とTh17との関連が示されている。そこで我々はTh17がBD病態形成に関連する可能性を追究した。

B. 研究方法

1. 対象

対象は厚生労働省BD診断基準を満たすBD 27例。健常人14例を対照として用いた。

2. CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>T細胞、IL-17産生細胞の検出

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、FACSCalibur（Becton Dickinson）を用いたフローサイトメトリーにより解析した。IL-17産生細胞はPBMCをmitogen（leukocyte activation cocktail, BD pharmingen）で4時間刺激後に回収し、BD cytoperm/cytofix（Becton Dickinson）処理後に蛍光標識抗IL-17抗体により染色し、フローサイトメトリーにより解析した。

### 3. 遊走能の解析

CCL20による遊走の誘導は TransWell® chamber systemを用いて評価した。

### 4. 血漿CCL20濃度の測定

血漿CCL20濃度はELISA (R&D systems)を用いて測定した。

### 5. Th17と関連する臓器病変の検討

BDの4主症状および副症状の有無で層別化し、mitogen刺激後に測定したTh17の比率を比較した。

### 6. 統計学的解析

2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

末梢血中のIL-17産生能を持つCD4<sup>+</sup>T細胞は、健常人と比較しBD患者で増加していた。IL-17産生細胞の大半がCCR6<sup>+</sup>であったことから、末梢血CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>細胞の比率を検討した。その結果、非活動期5例と比較し活動期9例ではその比率は減少していた。同一症例5例での比較においても同様であった。CCR6のリガンドであるCCL20を用いた遊走能の解析ではBDのCD4<sup>+</sup>T細胞の遊走がより誘導された(図1)。また血漿CCL20濃度は健常人に比べてBD患者で高かった。またTh17比率上昇と関連する病変として、眼病変のみが抽出された。

### D. 考察

BD患者末梢血中ではIL-17産生能をもつCD4<sup>+</sup>細胞が増加し、その大半がCCR6<sup>+</sup>であった。また活動期には末梢血中のCD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>細胞の割合が減少していた。さらに健常人と比較しBD患者でCD4<sup>+</sup>細胞のCCL20による遊走がより誘導された。これらよりBDでは末梢血中のCD4<sup>+</sup>T細胞がCCR6-CCL20 axisを介して病変局所に浸潤し、IL-17産生を介して病変形成に関与する可能性が考えられた。

ただしCD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>T細胞はその他のエフェクターを含んでおり、それらがBDの病態と関連する可能性も考えられる。またIL-17のみならずIL-22等Th17が産生する他のサイトカインが重要である可能性もある。今後さらなる検討が必要と考えられた。

### E. 結論

BDではTh17の前駆細胞が末梢血中で増加し、CCR6-CCL20 axisを介して病変局所に浸潤、外的刺激によりIL-17産生が誘導される結果、病態形成に関与する可能性が示唆された。

### F. 健康危険情報

特記事項なし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Yasuoka H, Yamaguchi Y, Mizuki N, Nishida T, Kawakami Y, and Kuwana M. Preferential activation of circulating CD8<sup>+</sup> and  $\gamma\delta$  T cells in patients with active Behçet's disease and HLA-B51. Clin. Exp. Rheumatol. 2008; 26(4, suppl): S59-S63.
2. 桑名正隆: ベーチェット病へのTNF阻害療法の使用の実際. Medical Practice 25 (8): 1425-1428, 2008.

3. 安岡秀剛、桑名正隆: ベーチェット病における細胞傷害性T細胞の役割. リンパ学 31(2): 45-49, 2008.
4. 安岡秀剛、桑名正隆: ベーチェット病治療の新たな試み. 日本医事新報 4458: 54-59, 2009.
5. Yamaguchi Y, Takahashi H, Satoh T, Okazaki Y, Mizuki N, Takahashi K, Ikezawa Z, and Kuwana M. Natural killer cells control a T helper 1 response in patients with Behçet's disease. Arthritis Res. Ther. 2010; 12(3): R80.
6. 桑名正隆: 抗TNF $\alpha$ 療法の適応拡大ー関節リウマチ以外の疾患治療に向けてー; ベーチェット病. 分子リウマチ治療 3(2): 61-64, 2010.

## 2. 学会発表

1. 安岡秀剛、桑名正隆: ベーチェット病における細胞傷害性T細胞の役割. 第32回日本リンパ学会総会 (東京). 2008. 6.
2. 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.
3. 桑名正隆: 教育研修講演; ベーチェット病. 第54回日本リウマチ学会総会 (神戸). 2010. 4.
4. 陳 竹、安岡秀剛、竹内 勤、桑名正隆: ベーチェット病病変部へのTh17前駆細胞の浸潤にMIP-3 $\alpha$ -CCR6 axisが関与している. 第54回日本リウマチ学会総会 (神戸). 2010. 4.
5. Hirohata S, Kikuchi H, Sawada T, Nagafuchi H, Kuwana M, Takeno M, Ishigatsubo Y: Neuro-Behçet's disease in Japan: a multicenter retrospective survey. 14th International Conference of Behçet's

Disease(London). 2010. 7.

6. Chen Z, Yasuoka H, Takeuchi T, Kuwana M: Involvement of MIP3 $\alpha$ -CCR6 axis in the recruitment of Th17 precursors to the lesions of Behçet's disease. 14th Congress of Asia Pacific League of Associations for Rheumatology(Hong Kong). 2010. 7.
7. Hirohata S, Kikuchi H, Sawada T, Nagafuchi H, Kuwana M, Takeno M, Ishigatsubo Y: Efficacy of cerebrospinal fluid testing and magnetic resonance imaging for diagnosis of Neuro-Behçet's disease: a multicenter retrospective analysis. The 74th Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology(Atlanta). 2010. 11.

## H. 知的財産権の出願、登録状況

### 1. 特許取得

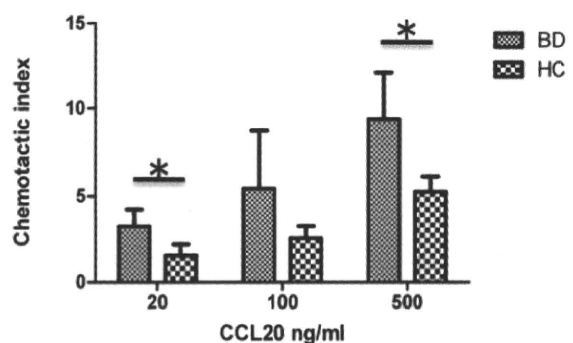
なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし



chemotactic indexはvehicleを1として計算。  
5回の実験の平均+標準偏差を示す。BD: ベーチェット病、HC: 健常人。

図1. CCL20によるCD4<sup>+</sup>T細胞の遊走能

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Th17細胞分化解析」

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  
研究協力者 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 総合南東北病院皮膚免疫アレルギー疾患研究所  
金子 栄 島根大学医学部 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、健康人に比較しTGF- $\beta$ レセプターおよびSmad2 mRNAの発現亢進、IL-23レセプター、ROR-C mRNAの減少傾向をみた。皮膚病変局所では、IFN- $\gamma$ 、TGF- $\beta$ 、IL-17が共染色されるCD4<sup>+</sup>T細胞が観察された。ナイーブCD4<sup>+</sup>T細胞を用いた分化実験では、Th17細胞誘導サイトカイン存在環境下ではIL-17産生の上昇傾向が見られ、Th17細胞のオートクリン増殖の可能性が示唆された。以上の結果はベーチェット病T細胞の異常が、造血発生に近い初期段階から存在する可能性を示すものと考えられる。

A. 研究目的

これまでにわれわれはベーチェット病（BD）の末梢血、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BDにおけるTh17細胞軸からの再評価を試みた。

B. 研究方法

① 象は活動性のあるBD患者n= 7、健常者n=12。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、BDを健常者と比較。測定したサイトカインmRNAはIL-17、IL-17F、IL-21、IL-22、IL-23、TGF- $\beta$  1。シグナル蛋白mRNA

はIL-23R、TGF- $\beta$  R1、2、3、IL-6ST、STAT1、STAT3、Smad2、Smad3、Smad7、SOCS1、SOCS3、Foxp3、ROR-C、Any1 hydrocarbon receptor（AHR）。

② 上記とは異なるBD患者4名の皮膚病変におけるIFN- $\gamma$ 、TGF- $\beta$  1、IL-17をCD4、8とともに免疫染色を実施。BD以外の結節性紅斑と比較。

③ 末梢血PBMC（BD 3名、健常者3名）を磁気ビーズにて、ナイーブとメモリーCD4<sup>+</sup>T細胞に分離。ナイーブ細胞はTh0、Th1、Th2、Th17環境下に各種サイトカインで刺激後、メモリー細胞は採取後すぐに細胞内サイトカイン染色法にてIFN- $\gamma$ 、TGF- $\beta$  1、IL-17陽性細胞の割合を評価。BD患者を健常者と比較した。

（倫理面への配慮）

本研究は、ヘルシンキ宣言（2008年ソウ