

を報告している。

本研究では HLA-B*51、HLA-A*26、IL 10 および IL 23 R-IL 12 RB の遺伝因子が本病の臨床像に与える影響を把握するため、病型、最終受診時視力およびインフリキシマブ治療効果と各遺伝因子の関連を調査した。

さらに本研究では、ベーチェット病の遺伝因子のさらなる探索のため、ImmunoChip (イルミナ社) を用いた遺伝子解析を実行し、ベーチェット病の新規疾患感受性遺伝子の同定を行った。ImmunoChip は、主要な自己免疫疾患や炎症性疾患をより詳細に解析するために開発されたカスタムメイドの DNA チップであり、慢性関節リウマチやクローン病など 12 種類の免疫関連疾患の GWAS データを元に 186 遺伝子座に位置する 196,524 個の多型 (195,806 個の SNPs (single nucleotide polymorphisms : 一塩基多型) を含む) がデザインされている。ImmunoChip を用いることで、免疫関連遺伝子領域に分布する SNP を高密度に解析することができ、GWAS では同定できなかった遺伝子多型を探索することが可能である。本研究では、ImmunoChip を用いて、免疫関連遺伝子領域の詳細な解析を実行した。

B. 研究方法

I) ベーチェット病感受性遺伝子多型と病型、病態、治療効果の検討

日本人ベーチェット病患者を対象に病型、最終受診時視力およびインフリキシマブの治療効果の臨床データを調査し、HLA-B*51、HLA-A*26、IL 10 多型および IL 23 R-IL 12 RB 多型との関連を検討した。

II) ImmunoChip を用いた免疫関連遺伝子領域の高密度解析によるベーチェット病感受性遺伝子の同定

① トルコ人ベーチェット病患者 2,014 例お

よび健常者 1,826 例を対象にイルミナ社の ImmunoChip を用いて遺伝子解析を実行した。ImmunoChip のジェノタイピング方法はイルミナ社のプロトコルを準拠して行った。本研究では、性染色体上に位置する SNP は解析から除外した。SNP の Quality Control (QC) として、コール率 >0.95 、マイナーアレル頻度 >0.01 、Hardy-Weinberg 平衡 >0.00001 を設定した。サンプルの QC については、コール率 >0.95 を設定するとともに、Identity by descent テストおよび主成分分析により、未報告の血縁者対および異なる祖先集団由来のサンプルを除外した。

② QC 基準を満たすサンプルおよび SNP を用いて患者・健常者間の関連解析を実行した。

③ 関連解析で $P < 5 \times 10^{-6}$ を示す新規の遺伝子領域を対象に imputation を実行し、本病と最も有意に相関する SNP を同定した。

ImmunoChip データの imputation は、1000 genomes CEU data を reference panel として、Impute 2 ソフトウェアを用いて実行した。basic allele test analysis および three model genotypic analysis において、それぞれ $P < 5 \times 10^{-8}$ および $P < 1.67 \times 10^{-8}$ を genome-wide significance (統計学的有意) とした。

(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、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

I) ベーチェット病感受性遺伝子多型と病型、病態、治療効果の検討

病型（表 1）：完全型の患者群において、IL 10 のリスクアリル（rs 1800872_A）をホモで保有する割合が不全型の患者群に比して有意に上昇した（ $P=0.0012$ ）。HLA-B*51、HLA-A*26 および IL 23 R-IL 12 RB リスクアリル（rs 1495965_G）では、完全型と不全型の患者群間でその保有率に有意な差は認められなかったが、HLA-B*51 と HLA-A*26 を各々ホモまたはヘテロで保有する割合が完全型の患者群において上昇した。IL 23 R-IL 12 RB のリスクアリル（rs 1495965_G）では、IL 10 のリスクアリル（rs 1800872_A）と同様に、リスクアリルをホモで保有する割合のみが完全型の患者群で上昇を示した。

主症状（表 2）：IL 10 のリスクアリル（rs 1800872_A）と 4 主症状の関連を検討した。4 症状ともに、リスクアリルをホモで保有する群において、その割合が上昇した。

視力予後（表 3）：4 遺伝因子ともに、リスクアリルをホモで保有する患者群において視力予後が不良になる傾向にあったが、いずれの遺伝因子においても視力予後との明確な関連は認められなかった。

インフリキシマブ治療効果（表 4）：いずれの遺伝因子においてもインフリキシマブの治療効果との関連は認められなかった。

II) ImmunoChip を用いた免疫関連遺伝子領域の高密度解析によるベーチェット病感受性遺伝子の同定

トルコ人患者 2,014 例、健常者 1,826 例を対象に ImmunoChip のジェノタイピングを行った。SNP の QC により、65,877 個の SNP が解析から除外された。また、サンプルの QC により、患者 114 例および健常者 27 例が除外された。

QC 基準を満たす 130,647 個の SNPs について、患者 1,900 例および健常者 1,799 例を対象に関連解析を行った結果、非 HLA 領域において $P < 5 \times 10^{-6}$ を示す 26 個の遺伝子領域（26 個のうち、21 個が新規）が認められた（図 1）。basic allele test analysis において、以前に報告されている IL 10、CCR 1、および新たに 4 つの遺伝子領域（IL 1 A-IL 1 B、SCHIP 1-IL 12 A、IRF 8、PTPN 1）において genome-wide significance を越える有意性が認められた。また、FUT 2 領域が劣性モデル（recessive model）で genome-wide significance を示した（表 5）。

同定した新規の 21 個の遺伝子領域を対象に imputation を行った結果、EGR 2 領域が新たに genome-wide significance を示した（表 5）。

D.E. 考察と結論

IL 10 のリスクアリル（rs 1800872_A）が他の遺伝的要因に比して、ベーチェット病の病態修飾に強く関与することが示唆された。ベーチェット病では、Th 1 優位の免疫応答が惹起されていることが報告されており、IL-10 はその Th 1 系の免疫応答に抑制的に働くサイトカインである。IL 10 のリスクアリルの保有が IL-10 の発現量の低下に繋がることから、IL 10 のリスクアリルに由来する IL-10 発現量の低下がベーチェット病の病態修飾に重要な役割を担っていると考えられた。また、今回調査した 4 遺伝因子ともにインフリキシマブの治療効果に有意な影響を示さなかった。したがって、インフリキシマブの治療効果には他の要因が関与することが示唆された。

今後、さらにデータの解析を進め、ベーチェット病の遺伝因子と臨床像の相関を明らかにするとともに、疾患発症のメカニズムを解明していく。

ImmunoChip を用いた免疫関連遺伝子領域の高密度なジェノタイピングでは、新規のベーチェット病感受性遺伝子を複数同定した。今後、日本人を含む他の人種・民族を用いて本解析で得られた有意な相関の再現性の検討 (replication study) を行うとともに、同定した遺伝子の機能解析を行うことで、ベーチェット病の発症に真に相関する新規の疾患感受性遺伝子の特定が期待される。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1) 国内

口頭発表 3 件

原著論文による発表 0 件

それ以外 (レビュー等) の発表 0 件

学会発表

1. 水木信久. ベーチェット病およびサルコイドーシスのゲノムワイド相関解析および機能解析. 眼科 DNA チップ研究会 (第 67 回日本臨床眼科学会) (横浜) 2013 年 11 月.
2. 目黒 明. 眼炎症性疾患の分子遺伝学的解析. 第 116 回日本眼科学会総会 (東京) 2012 年 4 月.
3. 竹内正樹、目黒 明、河越龍方、樋口亮太郎、望月 學、大野重昭、水木信久. IL 23 R-IL 12 RB 2、IL 10 遺伝子多型および HLA 多型とベーチェット病の臨床像との関連. 第 115 回日本眼科学会総会 (東京) 2011 年 5 月.

2) 海外

口頭発表 6 件

原著論文による発表 24 件

それ以外 (レビュー等) の発表 0 件

論文発表

1. Yoshida M, Meguro A, Okada E, Nomura N, Mizuki N. Association study of fibroblast growth factor 10 (FGF 10) polymorphisms with susceptibility to extreme myopia in a Japanese population. *Mol Vis* 2013;19:2321-2329.
2. Yoshida M, Meguro A, Yoshino A, Nomura N, Okada E, Mizuki N. Association study of IGF 1 polymorphisms with susceptibility to high myopia in a Japanese population. *Clin Ophthalmol* 2013;7:2057-2062.
3. Cheng CY, Schache M, Ikram MK, Young TL, Guggenheim JA, Vitart V, MacGregor S, Verhoeven VJ, Barathi VA, Liao J, Hysi PG, Bailey-Wilson JE, St Pourcain B, Kemp JP, McMahon G, Timpson NJ, Evans DM, Montgomery GW, Mishra A, Wang YX, Wang JJ, Roachchina E, Polasek O, Wright AF, Amin N, van Leeuwen EM, Wilson JF, Pennell CE, van Duijn CM, de Jong PT, Vingerling JR, Zhou X, Chen P, Li R, Tay WT, Zheng Y, Chew M; Consortium for Refractive Error and Myopia, Burdon KP, Craig JE, Iyengar SK, Igo RP Jr, Lass JH Jr; Fuchs' Genetics Multi-Center Study Group, Chew EY, Haller T, Mihailov E, Metspalu A, Wedenoja J, Simpson CL, Wojciechowski R, Hühn R, Mirshahi A, Zeller T, Pfeiffer N, Lackner KJ; Wellcome Trust Case Control Consortium 2, Bettecken T,

- Meitinger T, Oexle K, Pirastu M, Portas L, Nag A, Williams KM, Yonova-Doing E, Klein R, Klein BE, Hosseini SM, Paterson AD; Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions, and Complications Research Group, Makela KM, Lehtimaki T, Kahonen M, Raitakari O, Yoshimura N, Matsuda F, Chen LJ, Pang CP, Yip SP, Yap MK, Meguro A, Mizuki N, Inoko H, Foster PJ, Zhao JH, Vithana E, Tai ES, Fan Q, Xu L, Campbell H, Fleck B, Rudan I, Aung T, Hofman A, Uitterlinden AG, Bencic G, Khor CC, Forward H, Pärssinen O, Mitchell P, Rivadeneira F, Hewitt AW, Williams C, Oostra BA, Teo YY, Hammond CJ, Stambolian D, Mackey DA, Klaver CC, Wong TY, Saw SM, Baird PN. Nine loci for ocular axial length identified through genome-wide association studies, including shared loci with refractive error. *Am J Hum Genet* 2013;93(2):264-277.
4. Kanemaki N, Tchedre KT, Imayasu M, Kawarai S, Sakaguchi M, Yoshino A, Itoh N, Meguro A, Mizuki N. Dogs and Humans Share a Common Susceptibility Gene SRBD1 for Glaucoma Risk. *PLoS One* 2013;8(9):e74372.
 5. Kato T, Meguro A, Nomura E, Uemoto R, Nomura N, 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, Chin S, Ohno S, Inoko H, Mizuki N. Association study of genetic variants on chromosome 7q31 with susceptibility to normal tension glaucoma in a Japanese population. *Eye (Lond)* 2013;27(8):979-983.
 6. Kirino Y, Zhou Q, Ishigatsubo Y, Mizuki N, Tugal-Tutkun I, Seyahi E, Ozyazgan Y, Ugurlu S, Erer B, Abaci N, Ustek D, Meguro A, Ueda A, Takeno M, Inoko H, Ombrello MJ, Satorius CL, Maskeri B, Mullikin JC, Sun HW, Gutierrez-Cruz G, Kim Y, Wilson AF, Kastner DL, Gül A, Remmers EF. Targeted resequencing implicates the familial Mediterranean fever gene MEFV and the toll-like receptor 4 gene TLR4 in Behcet disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110(20):8134-8139.
 7. Yotsumoto S, Meguro A, Ishihara M, Uemoto R, Ota M, Morimoto SI, Kaburaki T, Ando Y, Takenaka S, Ohno S, Inoko H, Mizuki N. Investigation of the Association Between Toll-like Receptor 9 Gene Polymorphisms and Sarcoidosis in Japanese Patients. *Ocul Immunol Inflamm* 2013;21(3):234-236.
 8. Mikami T, Meguro A, Teshigawara T, Takeuchi M, Uemoto R, Kawagoe T, Nomura E, Asukata Y, Ishioka M, Iwasaki M, Fukagawa K, Konomi K, Shimazaki J, Nishida T, Mizuki N.

- Interleukin 1 beta promoter polymorphism is associated with keratoconus in a Japanese population. *Mol Vis* 2013;19:845-851.
9. Kirino Y, Bertias G, Ishigatsubo Y, Mizuki N, Tugal-Tutkun I, Seyahi E, Ozyazgan Y, Sacli FS, Erer B, Inoko H, Emrence Z, Cakar A, Abaci N, Ustek D, Satorius C, Ueda A, Takeno M, Kim Y, Wood GM, Ombrello MJ, Meguro A, Gül A, Remmers EF, Kastner DL. Genome-wide association analysis identifies new susceptibility loci for Behçet's disease and epistasis between HLA-B*51 and ERAP1. *Nat Genet* 2013;45(2):202-207.
 10. Lee YJ, Horie Y, Wallace GR, Choi YS, Park JA, Song R, Kang YM, Kang SW, Baek HJ, Kitaichi N, Meguro A, Mizuki N, Namba K, Ishida S, Kim J, Niemczek E, Lee EY, Song YW, Ohno S, Lee EB. Genome-wide association study identifies GIMAP as a novel susceptibility locus for Behçet's disease. *Ann Rheum Dis* 2013;72(9):1510-1516
 11. Nakasato-Sonn H, Uemoto R, Meguro A, Mizuki N. Modification of Swan-Jacobs lens for iridocorneal angle surgery. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2013;251(9):2247-2248.
 12. Uemoto R, Nakasato-Sonn H, Meguro A, Ito N, Yazama F, Mizuki N. Staining internal limiting membrane with a mixture of BBG and sodium hyaluronate. *Br J Ophthalmol* 2013;97(6):690-693.
 13. Suzuki H, Ota M, Meguro A, Katsuyama Y, Kawagoe T, Ishihara M, Asukata Y, Takeuchi M, Ito N, Shibuya E, Nomura E, Uemoto R, Nishide T, Namba K, Kitaichi N, Morimoto S, Kaburaki T, Ando Y, Takenaka S, Nakamura J, Saeki K, Ohno S, Inoko H, Mizuki N. Genetic Characterization and Susceptibility for Sarcoidosis in Japanese Patients: Risk Factors of BTNL2 Gene Polymorphisms and HLA Class II Alleles. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53(11):7109-7115.
 14. Meguro A, Ideta H, Ota M, Ito N, Ideta R, Yonemoto J, Takeuchi M, Uemoto R, Nishide T, Iijima Y, Kawagoe T, Okada E, Shiota T, Hagihara Y, Oka A, Inoko H, Mizuki N. Common variants in the COL4A4 gene confer susceptibility to lattice degeneration of the retina. *PLoS One* 2012;7(6):e39300.
 15. Fan Q, Barathi VA, Cheng CY, Zhou X, Meguro A, Nakata I, Khor CC, Goh LK, Li YJ, Lim W, Ho CE, Hawthorne F, Zheng Y, Chua D, Inoko H, Yamashiro K, Ohno-Matsui K, Matsuo K, Matsuda F, Vithana E, Seielstad M, Mizuki N, Beuerman RW, Tai ES, Yoshimura N, Aung T, Young TL, Wong TY, Teo YY, Saw SM. Genetic variants on chromosome 1q41 influence ocular axial length and high myopia. *PLoS Genet* 2012;8(6):e1002753.
 16. Sakuyama K, Meguro A, Ota M, Ishihara M, Uemoto R, Ito H, Okada E, Namba K, Kitaichi N, Morimoto S,

- Kaburaki T, Ando Y, Takenaka S, Yuasa T, Ohno S, Inoko H, Mizuki N. Lack of association between IL10 polymorphisms and sarcoidosis in Japanese patients. *Mol Vis* 2012;18:512-518.
17. Kawase K, Allingham RR, Meguro A, Mizuki N, Roos B, Solivan-Timpe FM, Robin AL, Ritch R, Fingert JH. Confirmation of TBK1 duplication in normal tension glaucoma. *Exp Eye Res* 2012;96(1):178-180.
18. Uemoto R, Nakasato-Sonn H, Kawagoe T, Meguro A, Okada E, Mizuki N. Factors associated with enlargement of chorioretinal atrophy after intravitreal bevacizumab for myopic choroidal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2012;250(7):989-997.
19. Horie Y, Meguro A, Kitaichi N, Lee EB, Kanda A, Noda K, Song YW, Park KS, Namba K, Ota M, Inoko H, Mizuki N, Ishida S, Ohno S. Replication of a microsatellite genome-wide association study of Behcet's disease in a Korean population. *Rheumatology (Oxford)* 2012;51(6):983-986.
20. Uemoto R, Nakasato-Sonn H, Meguro A, Okada E, Mizuki N. Anatomical and functional changes of retina following subretinal injection of high-speed fluid. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2012;250(3):447-450.
21. Ito R, Ota M, Meguro A, Katsuyama Y, Uemoto R, Nomura E, Nishide T, Kitaichi N, Horie Y, Namba K, Ohno S, Inoko H, Mizuki N. Investigation of association between TLR9 gene polymorphisms and VKH in Japanese patients. *Ocul Immunol Inflamm* 2011;19(3):202-205.
22. Yasumura R, Meguro A, Ota M, Nomura E, Uemoto R, 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 SLC1A3 gene polymorphisms and normal tension glaucoma. *Mol Vis* 2011;17:792-796.
23. Sato M, Kawagoe T, Meguro A, Ota M, Katsuyama Y, Ishihara M, Namba K, Kitaichi N, Morimoto S, Kaburaki T, Ando Y, Takenaka S, Ohno S, Inoko H, Mizuki N. Toll-like receptor 2 (TLR2) gene polymorphisms are not associated with sarcoidosis in the Japanese. *Mol Vis* 2011;17:731-736.
24. Sada T, Ota M, Katsuyama Y, Meguro A, Nomura E, Uemoto R, Nishide T, Okada E, Ohno S, Inoko H, Mizuki N. Association analysis of Toll-like receptor 7 gene polymorphisms and Behçet's disease in Japanese. *Hum Immunol* 2011;72(3):269-272.
- 学会発表
1. Takeuchi M, Mizuki N, Meguro A, Ombrello MJ, satorius C, Kirino Y,

- Kawagoe T, Ustek D, Tugal-tutkun I, Seyahi E, Ozyazgan Y, Ohno S, Ueda A, Ishigatsubo Y, Gul A, Kastner DL, Remmers E. High density genotyping of immune-related disease genes identifies 7 new susceptibility loci for Behçet's disease. 2013 ACR/ARHP Annual Meeting (San Diego, USA), Oct 2013.
2. Takeuchi M, Kawagoe T, Meguro A, Ishigatsubo Y, Remmers E, Kastner DL, Mizuki N. Behçet's disease: genotype-phenotype correlations. 7th Congress of ISSAID (Lausanne, Switzerland), May 2013.
 3. Meguro A, Kawagoe T, Nakahara M, Fukasaku H, Ohno S, Mizuki N. Association study of IL 23 R-IL 12 RB 2 and IL 10 gene polymorphisms with susceptibility to Vogt-Koyanagi-Harada disease in a Japanese population. ARVO 2013 Annual Meeting (Seattle, USA), May 2013.
 4. Mizuki N, Meguro A, Mochizuki M, Ohno S, Inoko H. Molecular genetics of Behçet's disease. 11th International Ocular Inflammation Society Congress (Goa, India), Nov 2011.
 5. Mizuki N, Meguro A, Asukata Y, Takeuchi M, Ohno S, Mochizuki M, Inoko H. Behçet's disease : role of regulatory T cells in disease remission. 11th International Ocular Inflammation Society Congress (Goa, India), Nov 2011.
 6. Mizuki N, Meguro A. Genome-wide association studies on multifactorial ocular diseases. 52nd annual meeting of Taiwan Ophthalmological Society (Taipei, Taiwan), Nov 2011.
- 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
特記事項なし。

表1. ベーチェット病遺伝因子と病型

HLA-B	B51/B51	B51/others	others/others	<i>P</i>
完全型 (N=164)	0.085	0.439	0.476	0.17
不全型 (N=225)	0.044	0.413	0.542	

HLA-A	A26/A261	A26/others	others/others	<i>P</i>
完全型 (N=164)	0.030	0.390	0.579	0.055
不全型 (N=225)	0.004	0.324	0.671	

IL10 rs1800872	A/A	A/C	C/C	<i>P</i>
完全型 (N=186)	0.694	0.258	0.048	0.0012
不全型 (N=255)	0.522	0.408	0.071	

IL23R rs1495965	G/G	G/A	A/A	<i>P</i>
完全型 (N=186)	0.333	0.495	0.172	0.37
不全型 (N=255)	0.271	0.545	0.184	

表2. IL10リスクアリル(rs1800872_A)と4主症状

	A/A (N=261)	A/C+C/C (N=179)	P
口腔内アフタ	0.989	0.972	0.20
皮膚症状	0.900	0.827	0.024
眼症状	0.893	0.827	0.046
外陰部潰瘍	0.648	0.553	0.046

表3. ベーチェット病遺伝因子と視力予後

HLA-B		IL10 rs1800872	
遺伝子型	最終視力0.1未満*	遺伝子型	最終視力0.1未満
B51/B51 (N=9)	5/9 (0.556)	A/A (N=58)	27/58 (0.466)
B51/others (N=47)	19/47 (0.404)	A/C (N=31)	11/31 (0.355)
others/others (N=43)	16/43 (0.372)	C/C (N=10)	2/10 (0.200)
HLA-A		IL23R rs1495965	
遺伝子型	最終視力0.1未満	遺伝子型	最終視力0.1未満
A26/A26 (N=1)	1/1 (1.000)	G/G (N=22)	12/22 (0.545)
A26/others (N=39)	13/39 (0.333)	G/A (N=47)	17/47 (0.362)
others/others (N=59)	26/59 (0.441)	A/A (N=30)	11/30 (0.367)

*最終受診時視力0.1未満を視力予後不良とした

表4. ベーチェット病遺伝因子とインフリキシマブ治療効果

インフリキシマブ投与間隔(週)

HLA-B			IL10 rs1800872		
遺伝子型		平均	遺伝子型		平均
B51/B51	(N=3)	7.33	A/A	(N=11)	6.73
B51/others	(N=10)	6.70	A/C	(N=11)	6.55
others/others	(N=9)	6.33	C/C	(N=0)	-
HLA-A			IL23R rs1495965		
遺伝子型		平均	遺伝子型		平均
A26/A26	(N=1)	6.00	G/G	(N=2)	8.00
A26/others	(N=11)	6.82	G/A	(N=17)	6.88
others/others	(N=10)	6.00	A/A	(N=3)	7.00

表 5. 本研究で同定された genome-wide significance を示す遺伝子領域

染色体	遺伝子領域	リスクアレル頻度		P値	オッズ比 (95%信頼区間)
		患者	健常者		
Additive model					
3	CCR1	0.730	0.660	9.21E-11	1.40 (1.26-1.54)
3	SCHIP1-IL12A	0.073	0.040	9.88E-10	1.90 (1.54-2.34)
20	PTPN1	0.474	0.404	1.45E-09	1.33 (1.21-1.46)
1	IL10	0.368	0.302	6.66E-09	1.34 (1.22-1.48)
2	IL1A-IL1B	0.360	0.298	1.29E-08	1.33 (1.20-1.46)
16	IRF8	0.926	0.887	2.19E-08	1.58 (1.35-1.85)
Recessive model					
19	FUT2	0.346	0.259	9.90E-09	1.51 (1.31-1.74)
Imputation analysis					
10	EGR2	0.737	0.665	1.67E-09	1.41 (1.26-1.57)

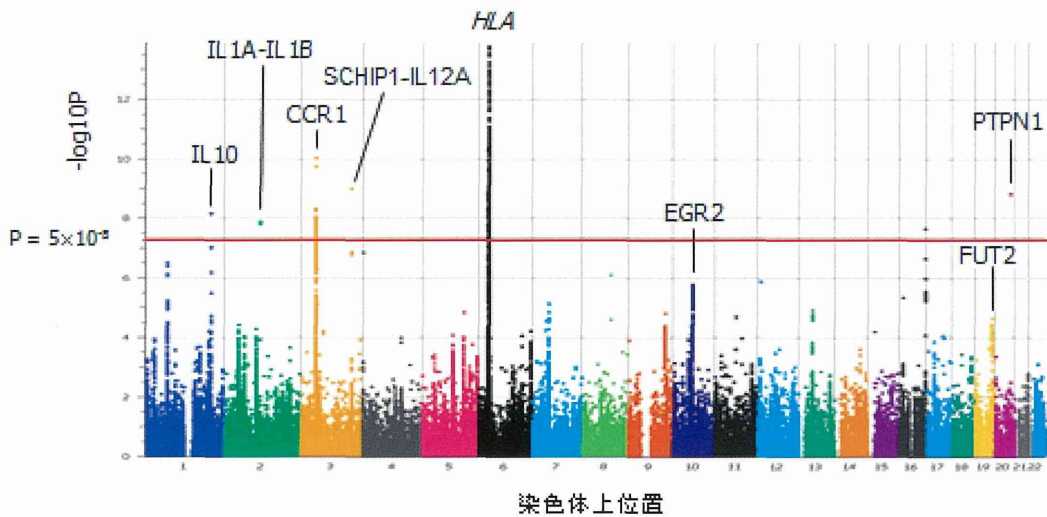


図 1. トルコ人集団の ImmunoChip 解析で得られたマンハッタンプロット
横軸は各 SNP が存在する染色体上の位置、縦軸はパーチェット病との関連の強さを示す。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業
（難治性疾患克服研究事業））分担研究報告書

ベーチェット病感受性遺伝子 TRIM 39 の機能解析と
ベーチェット病候補ゲノム領域の多型解析

研究分担者 椎名 隆 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学
研究協力者 鈴木 進悟 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学
光永 滋樹 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学
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
太田 正穂 信州大学医学部法医学教室

研究要旨

ベーチェット病 (Behçet's disease: BD) 発症の遺伝的要因として、*HLA-A*26*と *HLA-B*51* が報告されているが、我々はこれまでに、ヒト主要組織適合遺伝子複合体 (Human histocompatibility leukocyte antigen : HLA) の *HLA-A*26*と *HLA-B*51* と独立して BD に感受性を示す (Tripartite motifs 39) *TRIM 39* を同定した。*TRIM 39* および、その近傍の *Rpp 21* 遺伝子過剰発現系 HEK 293 T 細胞のマイクロアレイによる遺伝子発現解析により、*TRIM 39* と *Rpp 21* のキメラタンパク質である、*TRIM 39 R* がウイルスや細菌感染および 1 型 IFN 応答に関与することが示唆された。

また次世代シーケンサーなどの新規解析技術の進歩により、塩基配列レベルにおける全エクソン (エクソーム) や HLA 遺伝子全領域における多型解析が可能となった。そこで関節リウマチ (RA) を例としたエクソーム解析の方法論の開発、日本人集団に高頻度な上位 5 種類の HLA ハプロタイプにおける多型解析法の実施し、家族例などの DNA 検体を入手することができれば、直ちに開始できる準備を整えた。これら技術により、GWAS では検出されていない BD 関連多型・変異の検出が可能となり、本病の遺伝的要因の更なる解明につながることを期待される。

A. 研究目的

ベーチェット病 (Behçet's disease: BD) は環境要因と遺伝的要因が互いに作用し合う多因子疾患であり、様々な側面からの基礎研究が病態解明には必須である。我々は、ベーチェット病に関与する遺伝子の特定およびその機能から、病態解明を試みている。

これまでに多段階によるベーチェット病患者-健常者間における関連解析により、

TRIM 39 上の SNP(rs 2074474)に強い感受性を見出している。さらに連鎖不平衡解析により、*Rpp 21* 上の rs 974963 が rs 2074474 と強い LD ($r^2 > 0.9$) にあり、グリシンからリシンへの置換を伴う SNP であることを見出した。近年、cGMP-依存性タンパク質キナーゼ I をベイトとしたイーストツーハイブリッド法によるスクリーニングにより、*TRIM 39* および *Rpp 21* 遺伝子におけるイ

ンタージェニックプライミングによる、mRNA から翻訳されるキメラタンパク質 (TRIM 39-Rpp 21: TRIM 39 R) が相互作用分子として同定された。

一方、全ゲノム関連解析 (GWAS) ならびにそれに続く 21 個の感受性候補遺伝子におけるターゲットリシーケンシングにより 4 個の遺伝子 (*IL 23 R*, *TLR 4*, *NOD 2*, *MEFV*) が BD と関連することを報告している。最近、次世代シーケンサーなどの新規解析技術の進歩により、塩基配列レベルにおける全エクソン (エクソーム) や HLA 全領域における多型解析が可能となった。

そこで本課題では、(1) 各遺伝子の過剰発現系をヒト胎児腎細胞株の HEK 293 T 細胞を用いて樹立し、マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を行うことにより、ベーチェット病に關与する分子が野生型 TRIM 39 (TRIM 39 B)、TRIM 39 R および Rpp 21 のうち、いずれであるかについて検討することと、その分子の機能解析を目的とした。また、(2) 関節リウマチ (RA) を例としたエクソーム解析の方法論の開発、日本人集団に高頻度な上位 5 種類の HLA ハプロタイプにおける多型解析法の実施、患者のみに検出される非同義置換や挿入・欠失をカタログ化することにより、今後の大規模なゲノム関連解析のための研究基盤を整備することを目的にした。

B. 研究方法

(1) TRIM 39 の機能解析法

① 遺伝子発現ベクター作製法

ヒト骨髄由来 RNA より合成した cDNA を鋳型とし、TRIM 39 B、TRIM 39 R および Rpp 21 を PCR 法にて増幅した。得られた産物を pcDNA 6/V 5-His B ベクター (invitrogen) とライゲーションを行った。

②細胞培養法

ヒト胎児腎臓由来培養細胞の HEK 293 T は 10% Fatal Bovine Serum (FBS, Thermo SCIENTIFIC) 含有 D-MEM を培養液として用い、37°C 5% CO₂ で培養した。

③ トランスフェクション法

Fugene HD (promega) を用いてリポフェクション法にて、GFP 遺伝子と共トランスフェクションを行なった。

④ マイクロアレイ法

TRIM 39 B、TRIM 39 R、Rpp 21 より抽出した RNA をプローブとして、SurePrint G3 Human GE 8 X 60 K v2 (Agilent) を用いてハイブリダイゼーションを行い、Sure Scan マイクロアレイスキャナ (Agilent) で発現量の数値化を行った。

(2) 多型解析法

① エクソーム解析法

ヒトの全エクソンを網羅する SureSelect Human All Exon 50 Mb (アジレント社) を用いてエクソン領域のみの DNA 断片を回収し、その塩基配列を決定した。その後、ヒトゲノムの reference 配列へのマッピングにより variant を検出した。その後、患者とコントロール間にて統計学的有意差のみられる variant を選別し、それらをサンガー法にて検証した。

② HLA 遺伝子全領域における多型解析法

HLA 遺伝子全領域 3.8 Mb を網羅する計 390 本の PCR プライマーを用いた PCR 増幅ならびにシーケンシングキャプチャアレイを用いて HLA 遺伝子領域を網羅する DNA 断片の回収し、その塩基配列を決定した。その後、ヒトゲノムの reference 配列へのマッピングにより variant を検出し、検出された variant におけるハプロタイプ間の比較解析を行っ

た。これら解析には、HLA 日本人集団に高頻度な上位 5 種類の HLA ハプロタイプ (A 24-B 52-DR 15、A 33-B 44-DR 13、A 24-B 7-DR 1、A 24-B 54-DR 4 および A 2-B 46-DR 8) のホモ接合体ゲノム DNA を用いた。

(倫理面への配慮)

本課題ではヒト DNA サンプルを使用する遺伝子研究を実施するため、文部科学省、厚生労働省、経済産業省合同の策定による「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い、東海大学医学部が設置する医の倫理委員会に申請し、承認された検体を用いた。

C. 研究結果

(1) TRIM 39 の機能解析

① 遺伝子過剰発現系 HEK 293 T 細胞の樹立

CMV プロモーターを有する pcDNA 6/V 5-His B ベクターにヒト骨髄由来の TRIM 39 B、TRIM 39 R、Rpp 21 の cDNA を組み込んで、各遺伝子の発現ベクターを作製し、ヒト胎児腎細胞由来細胞株 HEK 293 T に GFP 発現ベクターの pcDNA 6.2 emGFP とともにトランスフェクションを行った。十分に遺伝子を発現させた 48 時間後に蛍光観察によって、GFP の蛍光が見られ、トランスフェクションされたことを確認した。また、内因性の TRIM 39 と区別するために、V 5 epitope タグに対する抗体を用いてウェスタンブロッティングを行い、インサートの各遺伝子が過剰発現されていることを確認した。

これらの結果から、遺伝子過剰発現系 HEK 293 T 細胞の樹立を確認した (図 1)。

② マイクロアレイ解析

各遺伝子とコントロールとして空ベクターをそれぞれ 4 サンプルずつ、過剰発現系 HEK 293 T 細胞を作成し、蛍光観察によ

て、遺伝子の導入を確認した後、マイクロアレイを行った。コントロールをリファレンスとした各遺伝子の解析の結果、発現量が有意に変動した遺伝子が、TRIM 39 B では 34 個、TRIM 39 R では 42 個、Rpp 21 では 0 個であった。また、このうち、TRIM 39 B と TRIM 39 R で共通の遺伝子は 8 個であった。TRIM 39 B および TRIM 39 B と TRIM 39 R で共通の遺伝子には、免疫応答に関与する遺伝子は見られなかった。一方、TRIM 39 R が誘導する遺伝子は、免疫に関与するものがほとんどであった。そこで、Gene Ontology 解析を行い、同定した遺伝子から予測される、TRIM 39 R が制御するパスウェイを有意差の大きい順にリスト化した。その結果、ウイルスや細菌感染および 1 型 IFN 応答に関与するパスウェイが多数予測された (図 2)。

(2) 次世代シーケンサーを用いた多型解析法の開発

① エクソーム解析法の開発

関節リウマチ (RA) を例として次世代シーケンサーによるエクソーム解析法の開発を行った。これまでに 19 人の患者を解析した結果、エクソーム解析では計 18,660 個の variant が特定され、その後のコントロールとの比較ならびにサンガー法による検証 (症例、対照、各 432 例) により、少なくとも 3 個の遺伝子、*BTNL2* ($p = 4.55 \text{ E-}09$), *NOTCH4* ($p = 4.02 \text{ E-}09$), *MYPN* ($p = 4.66 \text{ E-}3$) が RA と有意な関連を示した (図 3)。

② HLA 遺伝子全領域における多型解析法

HLA 日本人集団に高頻度な上位 5 種類の HLA ハプロタイプの塩基配列を決定した結果、ゲノムカバー率は 91.1%~99.2%、ゲノム重複度は 63.5~1135.4 であったことから、

質の高い HLA 領域のゲノム塩基配列を決定する技術開発に成功した。また、それら配列間におけるゲノム多様性解析から、同一の HLA アリルの HLA 遺伝子の起源は同一であり、遺伝子内には多型や変異はみられないこと、同一の HLA ハプロタイプの起源は同一であり、その多型や変異は異なる HLA ハプロタイプ間に比べて少ないこと、異なる HLA ハプロタイプ間では、HLA 遺伝子近傍に hitch-hiking 効果の結果と思われる多くの variation (塩基配列の違い) が、HLA 遺伝子の他に遺伝子間配列にも集積していることを明らかにした (図 4)。

D. 考察

(1) TRIM 39 の機能解析

TRIM 39 B、TRIM 39 R および Rpp 21 の過剰発現系 HEK 293 T 細胞のマイクロアレイによる遺伝子発現解析の結果、TRIM 39 R の系のみで、ウイルスや細菌感染および 1 型 IFN 応答に関与するパスウェイが予測された。このことから、TRIM 39 R がウイルスや細菌感染および 1 型 IFN 応答に関与することを示唆し、Th 1 型の免疫応答に関与することが示唆された。また、ベーチェット病の病態において、TRIM 39 R は炎症応答に関与すると考えられる。ベーチェット病患者-健常者間の関連解析が示した有意差は、TRIM 39 R を示している可能性が考えられた。

(2) 次世代シーケンサーを用いた多型解析法の開発

関節リウマチ (RA) の場合、GWAS で検出された数十の RA 感受性遺伝子でも説明できる遺伝要因はわずか数%のみである。これは、通常の GWAS では検出できない rare variant の関与が要因の一つであると

考えられている (common-disease multiple rare-variant 仮説)。また、全エクソンはヒトゲノムの 1% 程度の占有率にも拘らず、疾患原因の 85% はエクソンに同定されていることが報告されている (Choi et al. PNAS 106: 19096-19101, 2009)。したがって、エクソーム解析は全ゲノム配列決定と比較するとコストと時間が大幅に削減される GWAS では検出できない変異の検出が期待される。

一方、HLA 遺伝子全領域における多型解析法を開発したことから、本法を *HLA-B*51* ハプロタイプに応用することにより疾患感受性を示す variant の検出が期待される。

E. 結論

TRIM 39 および、その近傍の *Rpp 21* 遺伝子過剰発現系 HEK 293 T 細胞のマイクロアレイによる遺伝子発現解析により、TRIM 39 と Rpp 21 のキメラタンパク質である、TRIM 39 R がウイルスや細菌感染および 1 型 IFN 応答に関与することが示唆された。また次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析ならびに HLA 遺伝子領域における多型解析法の一連の操作過程を習得し、本研究に使用する家族例などの DNA 検体を入手することが出来れば、直ちに開始できる準備を整えた。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1) 国内

口頭発表	12 件
原著論文による発表	1 件
それ以外 (レビュー等) の発表	1 件

論文発表

1. 尾崎有紀、鈴木進悟、重成敦子、吉川枝里、岡晃、光永滋樹、椎名隆、猪子英俊. HLA 遺伝子における超高解像度 DNA タイピング法 (SS-SBT) の開発. *DNA Polymorphism* 21: 160-163, 2013.

学会発表

1. 猪子英俊. ベーチェット病と関節リウマチの遺伝子解析. 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会シンポジウム「リウマチ性疾患の疾患感受性遺伝子」, 2011.
2. 奥平裕子、光永滋樹、國井七絵、細道一善、田中政之、林英樹、河田寿子、鈴木康夫、佐藤慎二、本間康彦、井ノ上逸朗、猪子英俊. エクソーム解析による関節リウマチ感受性遺伝子の探索. 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011.
3. 中岡博史、崔泰林、田嶋敦、光永滋樹、猪子英俊、井ノ上逸朗. 関節リウマチにおけるシステムズ・ジェネティクス・アプローチ感受性遺伝子座から生物学的経路の推定. 日本人類遺伝学会第 56 回大会, 2011.
4. 倉田里穂、中岡博史、田嶋敦、米沢朋、猪子英俊. HLA 領域に位置する新規ベーチェット病感受性遺伝子の炎症応答に関する機能解析. 第 21 回日本組織適合性学会, 2012.
5. 光永滋樹、井ノ上逸朗、猪子英俊. エクソーム解析による関節リウマチ感受性遺伝子における稀少変異の探索. 生命科学系 3 分野支援活動 (がん、ゲノム、脳) 合同シンポジウム「生命科学・医学の発展を支える研究基盤の未来モデルケースとしての支援 3 領域」, 2012.
6. 奥平裕子、光永滋樹、鈴木康夫、桑名正隆、佐藤慎二、金子祐子、本間康彦、成

田暁、柏瀬貢一、井ノ上逸朗、猪子英俊. 関節リウマチと HLA 6 座との関連解析. 第 21 回日本組織適合性学会大会, 2012.

7. 猪子英俊. ベーチェット病と関節リウマチの遺伝子解析. 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会シンポジウム「リウマチ性疾患の疾患感受性遺伝子」, 2012.
8. 奥平裕子、光永滋樹、細道一善、中岡博文、井ノ上逸朗、柏瀬貢一、椎名隆、猪子英俊. BTNL2 は HLA-DRB1 からは独立して関節リウマチ発症リスクを付与する. 第 22 回日本組織適合性学会大会, 2013.
9. 尾崎有紀、鈴木進悟、重成敦子、榎屋安里、吉川枝里、岡晃、太田正穂、光永滋樹、猪子英俊、椎名隆. SS-SBT 法の開発 (1): HLA-DRB3/4/5 プライマーの開発と HLA 11 遺伝子座における PCR 条件の統一化. 第 22 回日本組織適合性学会大会, 2013.
10. 鈴木進悟、尾崎有紀、Swati Ranade、Jeff Quinn、Jason Chin、重成敦子、榎屋安里、光永滋樹、高橋直生、大崎研、太田正穂、猪子英俊、椎名隆. SS-SBT 法の開発 (2): 次世代シーケンサーを用いた HLA アリル全長配列収集法の開発. 第 22 回日本組織適合性学会大会, 2013.
11. 椎名隆、尾崎有紀、鈴木進悟、重成敦子、榎屋安里、吉川枝里、岡晃、太田正穂、光永滋樹、猪子英俊. SS-SBT 法の開発 (3): 実用化を目指した簡略化や迅速化に関する研究. 第 22 回日本組織適合性学会大会, 2013.
12. 尾崎有紀、鈴木進悟、重成敦子、榎屋安里、吉川枝里、岡晃、太田正穂、光永滋樹、猪子英俊、椎名隆. 新しい HLA アリル判定法、SS-SBT 法の実用化に関する

る研究. 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013.

それ以外 (レビュー等) の発表

1. 椎名隆、鈴木進悟、尾崎有紀、猪子英俊. HLA ゲノム構造と多型性. *血液フロンティア* 23: 21-29, 2013.

2) 海外

口頭発表	3 件
原著論文による発表	17 件
それ以外 (レビュー等) の発表	0 件

論文発表

1. Sada T, Ota M, Katsuyama Y, Meguro A, Nomura E, Uemoto R, Nishide T, Okada E, Ohno S, Inoko H, Mizuki N: Association analysis of Toll-like receptor 7 gene polymorphisms and Behçet's disease in Japanese patients. *Hum Immunol.* 72: 269-272, 2011.
2. Horie Y, Meguro A, Kitaichi N, Lee EB, Kanda A, Noda K, Song YW, Park KS, Namba K, Ota M, Inoko H, Mizuki N, Ishida S, Ohno S. Replication of a microsatellite genome-wide association study of Behçet's disease in a Korean population. *Rheumatology* 51: 983-6, 2012.
3. Meguro A, Ideta H, Ota M, Ito N, Ideta R, Yonemoto J, Takeuchi M, Uemoto R, Nishide T, Iijima Y, Kawagoe T, Okada E, Shiota T, Hagihara Y, Oka A, Inoko H, Mizuki N. Common variants in the COL4A4 gene confer susceptibility to lattice degeneration of the retina. *Plos ONE* 7: e39300, 2012.
4. Oka A, Mabuchi T, Ozawa A, Inoko H. Current understanding of human genetics and genetic analysis of psoriasis. *J Dermatol.* 39: 231-241, 2012.
5. Sakuyama K, Meguro A, Ota M, Ishihara M, Uemoto R, Ito H, Okada E, Namba K, Kitaichi N, Morimoto S, Kaburaki T, Ando Y, Takenaka S, Yuasa T, Ohno S, Inoko H, Mizuki N. Lack of association between IL10 polymorphisms and sarcoidosis in Japanese patients. *Mol Vis.* 18: 512-518, 2012.
6. Mitsunaga S, Suzuki Y, Kuwana M, Sato S, Kaneko Y, Homma Y, Narita A, Kashiwase K, Okudaira Y, Inoue I, Kulski JK, Inoko H. Associations between six classical HLA loci and rheumatoid arthritis: a comprehensive analysis. *Tissue Antigens* 80: 16-25, 2012.
7. Shiina T, Suzuki S, Ozaki Y, Taira H, Kikkawa E, Shigenari A, Oka A, Umemura T, Joshita S, Takahashi O, Hayashi Y, Paumen M, Katsuyama Y, Mitsunaga S, Ota M, Kulski JK, Inoko H. Super high resolution for single molecule-sequence-based typing of classical HLA loci at the 8-digit level using next generation sequencers. *Tissue Antigens* 80: 305-316, 2012.
8. Suzuki H, Ota M, Meguro A, Katsuyama Y, Kawagoe T, Ishihara M, Asukata Y, Takeuchi M, Ito N, Shibuya E, Nomura E, Uemoto R, Nishide T, Namba K, Kitaichi N,

- Morimoto S, Kaburaki T, Ando Y, Takenaka S, Nakamura J, Saeki K, Ohno S, Inoko H, Mizuki N. Genetic characterization and susceptibility for sarcoidosis in Japanese patients: risk factors of BTNL2 gene polymorphisms and HLA class II alleles. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 53: 7109-7115, 2012.
9. Mitsunaga S, Hosomichi K, Okudaira Y, Nakaoka H, Kunii N, Suzuki Y, Kuwana M, Sato S, Kaneko Y, Homma Y, Kashiwase K, Azuma F, Kulski JK, Inoue I, Inoko H. Exome sequencing identifies novel rheumatoid arthritis-susceptible variants in the BTNL2. *J Hum Genet*. 58: 210-215, 2013.
 10. Miyazono T, Shiina T, Michino J, Yasumura S, Sugiyama T. A novel HLA-B allele, HLA-B*39:01:16, identified by super high-resolution single-molecule sequence-based typing in a Japanese individual. *Tissue Antigens* 82: 205-206, 2013.
 11. Jinam TA, Nakaoka H, Hosomichi K, Mitsunaga S, Okada H, Tanaka A, Tanaka K, Inoue I. HLA-DPB1*04:01 allele is associated with non-obstructive azoospermia in Japanese patients. *Hum Genet* 132: 1405-11, 2013.
 12. Hosomichi K, Jinam TA, Mitsunaga S, Nakaoka H, Inoue I. Phase-defined complete sequencing of the HLA genes by next-generation sequencing. *BMC Genomics* 14: 355, 2013.
 13. Nakaoka H, Mitsunaga S, Hosomichi K, Shyh-Yuh L, Sawamoto T, Fujiwara T, Tsutsui N, Suematsu K, Shinagawa A, Inoko H, Inoue I. Detection of ancestry informative HLA alleles confirms the admixed origins of Japanese population. *PLoS ONE* 8: e60793, 2013.
 14. Mitsunaga S, Shimizu S, Okudaira Y, Oka A, Tanaka M, Kimura M, Kulski JK, Inoue I, Inoko H. Improved loop-mediated isothermal amplification for HLA-DRB1 genotyping using RecA and a restriction enzyme for enhanced amplification specificity. *Immunogenetics* 65: 405-15, 2013.
 15. Mitsunaga S, Suzuki Y, Kuwana M, Sato S, Kaneko Y, Homma Y, Narita A, Kashiwase K, Okudaira Y, Inoue I, Kulski JK, Inoko H. Associations between six classical HLA loci and rheumatoid arthritis: a comprehensive analysis. *Tissue Antigens* 80:16-25, 2012.
 16. Ozaki Y, Suzuki S, Shigenari A, Okudaira Y, Kikkawa E, Oka A, Ota M, Mitsunaga S, Kulski JK, Inoko H, Shiina T. HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4 and -DRB5 genotyping at a super-high resolution level by long range PCR and high throughput sequencing. *Tissue Antigens*, In press.
 17. Wada A, Shiina T, Michino J, Yasumura S, Sugiyama T. A novel HLA-B allele, HLA-B*44:184, identified by super high-resolution single-molecule sequence-based typing in a Japanese. *Tissue Antigens*, In press.

学会発表

1. Kurata R, Yonezawa T, Nakajima T, Takada S, Asahara H. LC-MS/MS-based shotgun proteomics identified the targets of arthritis-related microRNA. The First Bio-Rheumatology International Congress (BRIC) Tokyo, 2011.
2. Nakaoka H, Mitsunaga S, Inoko H, Inoue I. Integrative analysis of whole-gene co-expression network and exome sequence data to characterize pathways relevant to rheumatoid arthritis. 62nd Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, 2012.
3. Shiina T, Ozaki Y, Suzuki S, Kikkawa E, Shigenari A, Oka A, Mitsunaga S, Ota M, Inoko H. Development of super high resolution single molecule sequence based typing (SS-SBT) method at the field 4 level without ambiguity. The 27th European Immunogenetics and Histocompatibility Conference, 2013.

H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得

- (1) 名称：HLA 遺伝子の DNA タイピング方法及びキット、特許番号：国際公開：WO 2013/011734 A 1、発明者：椎名 隆、鈴木 進悟、尾崎 有紀、光永 滋樹、猪子 英俊、特許権所有者：ジェノダイブファーマ株式会社
- (2) 名称：HLA 遺伝子のマルチプレックス DNA タイピング方法及びキット、特許番号：特願 2013-099547、発明者：椎名 隆、鈴木 進悟、尾崎 有紀、光永 滋樹、

猪子 英俊、特許権所有者：ジェノダイブファーマ株式会社、

- (3) 名称：超並列高速シーケンサーによる簡便な HLA 遺伝子の DNA タイピング方法及びキット、特許番号：特願 2013-244624、発明者：椎名 隆、鈴木 進悟、尾崎 有紀、光永 滋樹、猪子 英俊、特許権所有者：ジェノダイブファーマ株式会社

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

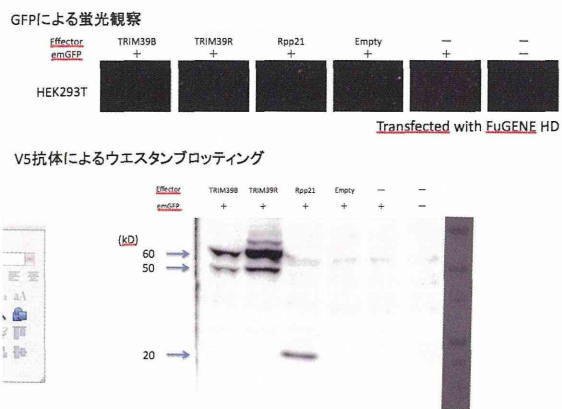


図 1. 遺伝子過剰発現細胞を樹立した

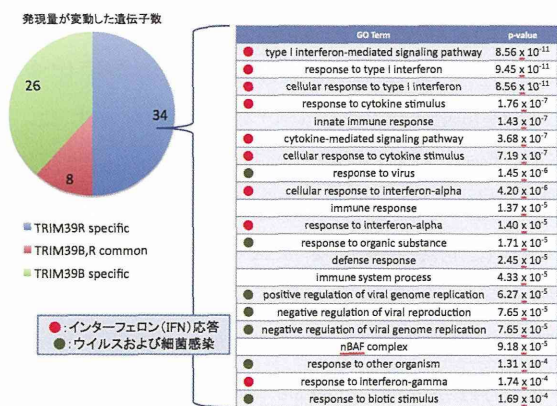


図 2. TRIM 39 R はウイルスや細菌感染および 1 型 IFN 応答に関与する

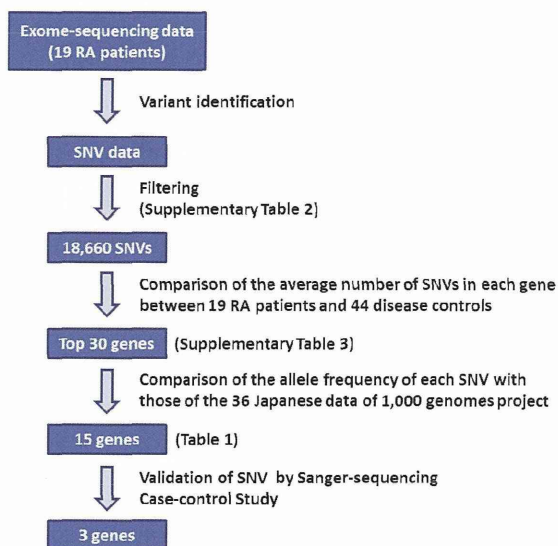


図 3. エクソーム解析による RA 候補遺伝子特定するための過程

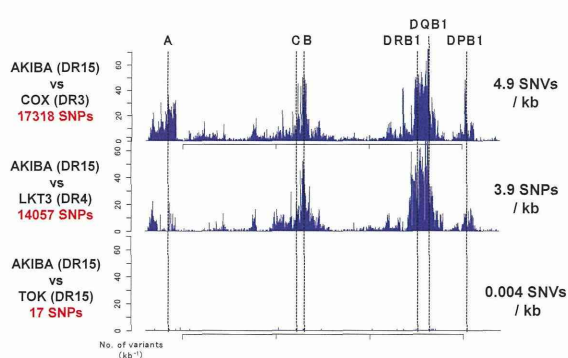


図 4. HLA ハプロタイプ間と内におけるゲノム多様性の比較

A 24-B 52-DR 15 と異なる検体由来の A 24-B 52-DR 15 との比較、A 24-B 52-DR 15 と異なる HLA ハプロタイプ間における多様性プロファイルを示す。横軸は各領域（左側からクラス I、クラス III、クラス II の順）を示し、縦軸は 100 塩基あたりの塩基置換数を示した。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業
（難治性疾患克服研究事業））分担研究報告書

ベーチェット病動物モデルの免疫異常解析と制御法の開発に関する研究
—NKT 細胞を標的とした実験的自己免疫性網膜ぶどう膜炎 (EAU) の炎症制御—

研究分担者	岩渕和也	北里大学医学部免疫学
研究協力者	佐藤 雅	北里大学医学部免疫学
	遠藤賀子	北里大学医学部免疫学
	北市伸義	北海道医療大個体差医療科学センター眼科学
	南場研一・石田 晋	北大院医眼科学分野
	大野重昭	北大院医炎症眼科学講座
	谷口 克	理研免疫アレルギー科学総合研究センター

研究要旨

我々は以前 NKT 細胞欠損マウス ($J\alpha 18^{-/-}$, $CD1d^{-/-}$) では EAU の臨床スコアが重症化することから、野生型マウスでは NKT 細胞が EAU の病態進展を抑制している可能性を示した。しかし、プロトタイプリガンド α -galactosylceramide (α -GC) 投与による NKT 細胞活性化は、EAU を軽症化することには無効であった。新規リガンドを含むいくつかのリガンドを抗原感作時（予防的投与）あるいは発症時（治療的投与）に EAU 誘導マウスに適用し、投与した NKT 2 リガンドが発症時投与でも有意に軽症化出来ることを見出した。選択的 NKT 細胞活性化により眼内への hIRBP/I-A^b tetramer⁺ T 細胞の浸潤が減少することが、奏効メカニズムと推測された。予防的投与に限っては、IFN- γ 誘導能の高い新規 NKT 細胞リガンド (RCAI-56: 理研) でも抗原特異的 T 細胞からの IFN- γ 、TNF- α 、IL-17、IL-22 産生が低下を伴って、病理組織学スコアが有意に低下したが、発症時投与では病理組織スコアの重症化が認められた。

A. 研究目的

NKT 細胞は CD1d 拘束性に糖脂質抗原を認識する自然 T 細胞の 1 亜群で、T 細胞抗原受容体 (TCR) とその認識抗原によって type I ($V\alpha 14 J\alpha 18^{+}; \alpha$ -GC) ・ type II (diverse TCR⁺; 多様な糖脂質・リン脂質) のサブセットに分類される¹。NKT 細胞は自身が、がん・感染防御におけるエフェクターとなる他、炎症に対する増強あるいは抑制作用も発揮し得る。眼炎症に対しても何らかの抑制的機能を有している可能性が期待され、

実際に NKT 細胞は前房関連免疫偏倚 (ACAID) 成立に重要な役割を果たしていることが既に明らかにされている²。

NKT 欠損マウス ($CD1d^{-/-} \cdot J\alpha 18^{-/-}$) と C57BL/6 (B6; 野生型) に EAU を誘導した場合、あるいは B6 に EAU を誘導し、NKT 細胞リガンドの α -GC で NKT 細胞を活性化した場合のそれぞれで EAU の発症・進展過程を比較した。その結果、NKT 細胞欠損マウスでは、EAU は重症化した。野生型マウスで NKT 細胞を通常の type I

NKT リガンドで活性化しても、EAU は軽症化しなかった³。また実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の系で、軽症化が報告された type II NKT 細胞リガンドであるスルファチド⁴ の投与でも、逆に臨床スコアの重症化が誘導されることをこれまで報告してきた³。近年、多様な NKT 細胞リガンドが合成され、それぞれに特徴的な免疫偏倚を有し、様々な用途が考えられている⁵。NKT 細胞が欠損した状態では EAU は重症化することから、NKT 細胞はぶどう膜炎に対して抑制的に機能すると考えられ、適切なりガンドを選択すれば予防あるいは治療が可能と推測された。そこで、利用可能な NKT 細胞リガンドを投与し、その奏効メカニズムを明らかにすべく研究を行った。

B. 研究方法

1. EAU の誘導と評価法：6 週齢 B6♀ マウスに、ヒト視細胞間レチノイド結合蛋白質ペプチド (hIRBP₁₋₂₀:GPTHFLFQPSLVLDMAKVLLD) 200 μ g を完全アジュバントとともに側腹部皮下に免疫し、同日に百日咳毒素 0.2 μ g を腹腔内投与することによって誘導した⁶。3 週間後、眼球はグルタルアルデヒド前固定/ホルマリン後固定後、パラフィン切片を HE 染色し、病理組織学的評価 (0~4) を行った。
2. NKT 細胞リガンドの投与：理化学研究所で新しく開発された NKT 1 偏倚リガンド RCAI-56 (α -carba-GalCer)⁷、プロトタイプリガンド α -GC および NKT 2 偏倚リガンド 1 化合物をそれぞれ 2 μ g/匹、対照群は vehicle のみ同量を用いた。予防的投与では、表記の量を感作時に hIRBP/CFA 乳剤と混合して皮下投与し、治療的投与では hIRBP₁₋₂₀ 感作後 9~10

日目の症状初発時期に同量を静注した。

3. NKT 細胞・T 細胞のフローサイトメトリ解析：所属リンパ節・脾臓はホモジェナイザーで単一細胞浮遊液にした、眼内浸潤リンパ球は眼組織をレンズ除去後に細切し、コラゲナーゼ D と 37° C 1 hr インキュベートした後に遠心、メッシュを通過させた試料として回収した。NKT 細胞の検出は α -GC-loaded CD1d-dimer anti-mouse IgG₁-PE/anti-TCR β -FITC/anti-NK 1.1-APC (BD Bioscience) あるいは、 α -GC-loaded CD1d-tetramer-PE (NIH Tetramer Facility より供与)⁸/anti-TCR β -FITC/anti-NK 1.1-APC で染色することで同定した。一方、T 細胞は通常の anti-CD 3, -CD 4, -CD 8 抗体 (BioLegend) で染色する他、抗原特異的 T 細胞を IRBP₃₋₁₃/I-A^b tetramer-PE (NIH Tetramer Facility より供与)⁸/anti-CD 4-APC/anti-CD 3-FITC で染色し、CD 3⁺画分について CD 4⁺tetramer⁺として算出した。
4. 抗原特異的 T 細胞によるサイトカイン産生の評価：hIRBP 特異的 T 細胞応答は感作後 21 日目の所属リンパ節 T 細胞画分を IRBP₁₋₂₀ ペプチドと 30 GyX 線照射した B6 脾細胞をインキュベートし、上清のサイトカイン産生は FlowCytomix (eBiosciences) を用いて定量した。
(倫理面への配慮)
動物実験は北里大学動物実験委員会で審議を経たのち、許可を得てから実施した (#2011-106、#2012-108、#2013-145)。

C. 研究結果

- ① 予防的投与実験：RCAI-56 投与群における感作後 21 日後の組織病理スコアは 0.32 \pm 0.80 (n=14)、vehicle 投与群 2.2 \pm