

平成 22 年 5 月 10 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19406028

研究課題名（和文） 人種差を示す難治性内眼炎の疾患感受性遺伝子の検索と
新規抗酸化治療法の開発研究課題名（英文） Investigation of disease susceptibility genes associated with
intractable intraocular inflammation with racial differences and development of new
antioxidant therapy

研究代表者

大野 重昭 (OHNO SHIGEAKI)

北海道大学・大学院医学研究科・特任教授

研究者番号：50002382

研究成果の概要（和文）：ベーチェット病の全ゲノム検索では HLA-B*510101 以外にも 2 つの新規遺伝子を見出し、Vogt-小柳-原田病でも HLA-DRB1*0405 および他の疾患感受性遺伝子との相関を見出した。一方、アデノウイルス角結膜炎の病因検索で、世界初の 2 種のアデノウイルス（53 型、54 型）を発見した。一方、新規抗酸化物質アスタキサンチンは有意にヒト眼底血流を改善した。また、新たな NF- κ B 阻害薬である DHMEQ は実験的ぶどう膜網膜炎を有意に消炎した。

研究成果の概要（英文）：In GWAS studies in Behcet disease, 2 new genes and HLA-B*510101 were found. In Vogt-Koyanagi-Harada disease, HLA-DRB1*0405 and several genetic associations were also found. Virological studies revealed 2 new human adenoviruses (HAdV 53 and 54). One of the carotenoids, astaxanthin showed significant increase of choroidal blood flow. DHMEQ, a new NF- κ B blocker also showed significant suppression of experimental uveoretinitis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2008 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2009 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	13,000,000	3,900,000	16,900,000

研究分野：眼科学

科研費の分科・細目：眼科学

キーワード：疾患感受性遺伝子、ベーチェット病、難治性内眼炎、アデノウイルス角結膜炎、分子疫学

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは難治性内眼炎と HLA との相関を世界に先駆けて発見し、その後世界的規模で疫学調査、最新の分子生物学的手法を

用いた解析など先駆的な研究を行ってきた。これらの疾患は欧米諸国において必ずしも高頻度に見られる疾患ではないため、これらの発症機構の解明は我々日本人研究者の手

にゆだねられている。すなわち、研究代表者らの研究が世界最先端の研究であり、これまでも世界の期待に応えてきた。またシルクロードにおける少数民族の内眼炎調査を計画しているグループは現在のところ我々を除き世界でも見あたらない。一方、ウイルス性結膜炎は院内感染としても重要であるにもかかわらず、その感染機序、予防、治療に関する研究はほとんど進んでおらず、**genotype**の変異と流行に関連があることを報告しているのは世界でも我々のみである。また、**HSV** 感染症は同一ウイルスの感染でも眼病変が異なる。特に急性網膜壊死は現在でも5割が失明する疾患であり、ウイルス側の指向性の要因、感染形態 (**receptor** への接着、細胞への侵入など) の解明は世界的にむけて大きく貢献できることを確信する。

2. 研究の目的

ベーチェット病、**Vogt-小柳-原田病**、サルコイドーシスに代表される内眼炎、ぶどう膜炎は難治であり、遺伝的要素と外因的要素が複雑に絡み合っ引き起こされる疾病である。本研究課題ではこれまでの成果をもとに新たな手法を用いて、ベーチェット病、原田病、サルコイドーシスなどの疾患感受性遺伝子の発見をめざす。このため、諸外国の共同研究者と研究グループを結成し、患者からのDNAを収集し研究を進める。

一方、アデノウイルス(**AdV**)は、眼科領域では流行性角結膜炎の原因ウイルスで、わが国のみならず世界的にその流行が毎年繰り返されている。わが国では年間約100万人の新規罹患患者が存在する。しかしその流行の本態、原因、病態などの詳細は依然として不明であり、結膜炎や角膜炎を起こす血清型についてウイルス自体の性状すら不明なことが多い。そこで我々が独自に開発した**PCR-RFLP**法を用い、**AdV**角結膜炎の日本のみならず、近隣諸国の疫学情報を調査する。そのため、国家横断的な**AdV**国際サーベイランスセンターの設立も検討する。また、類似の疾患対照として、紫外線照射による角結膜炎、ヘルペスウイルス角膜炎の病態解明、新規治療法の開発をも試みる。

3. 研究の方法

(1) 疾患感受性遺伝子の発見・同定

約3万個のマイクロサテライトマーカーを用いてゲノムワイドにベーチェット病、原田病およびサルコイドーシスの責任遺伝子を検索する。

① ベーチェット病、原田病およびサルコイドーシス患者およびその国の健常者を対象として、各疾患患者300人から文書による同意のもとに採血する。

現地調査、患者診察、採血については各疾患の患者の臨床症状を正しく把握する意味でも我々が直接現地に出向いて行う。また海外研究協力者が行う場合は臨床症状を詳細に記録し、血液の郵送は北海道大学大学院医学研究科に対し空輸で行う。

② 100人1集団として、各検体のDNA濃度が均一になるように調整、混合し、**pooled DNA** 溶液を作成する。**Pooled DNA** (**PCR1** 反応あたり 24 ng)、DNAポリメラーゼ、**dNTP**、**buffer** などの混合溶液を、ロボットで96穴プレート約300枚に分注する。3万個の各**MS**マーカーの蛍光標識プライマーを含む溶液を、上記で作成した96穴プレートに、ロボットを用いて瞬時に混合し、直ちに**PCR**を行う。すなわち、一集団の**pooled DNA** に対して3万回の**PCR**を機械的に系統的に行う。

③ **PCR**産物を、蛍光自動DNA解析機(**ABI 3700 DNA analyzer**)で電気泳動し、**Gene Scan** ソフトウェアにて**MS**のアリル分布を解析する。100人から150人分の合計(**pooled DNA**)の波形が得られ、波形パターンからすべてのピークの高さの総和を求め、その値に対してそれぞれのピークの高さの割合を求めることによって推定頻度を算出する。

④ 算出された推定アリル頻度をメインコンピュータのデータベースに登録し、3万マーカーそれぞれについて、疾患群のアリル分布と健常群のアリル分布を統計学的に比較、検討する。**Fisher**の2×2、2×nなどの検定法を用いた統計学的解析により、疾患遺伝子と相関する陽性**MS**マーカーを検出する。

⑤ 疑陽性**MS**マーカーを除外するため、同じ疾患で別の100人から150人の患者集団を用いて同様の解析を行う。患者集団のサブグループ基準としては、**HLA**および年齢、性別、臨床症状(例えばベーチェット病の場合では完全型、不全型等)などに基づく。

⑥ 3次スクリーニングまでを行い、陽性となったマーカーについてすべての検体を用いて**individual**タイピングを行い、陽性マーカーの確認をする。こうして、最終的に疾患遺伝子と相関する**MS**マーカーを決定し、疾患遺伝子の存在する領域をゲノム上で100 kb以内に絞り込む(**MS**マッピング終了)。

以上の方法で絞り込まれた領域で**SNP**多型解析、またはダイレクトシーケンシングを行い、疾患特異的アリル変異を同定する。

(2) ウイルス性眼疾患における分子疫学的検討

従来の**PCR-RFLP**法では同定不能な臨床分離株が、近年アデノウイルス結膜炎患者から多数分離されている。我々はこれまで、**PCR-RFLP**法の改良法により迅速かつ高感度なアデノウイルス検出法の開発を行った。

本研究ではこの新しい解析方法を用い、これまで同定不能であったアデノウイルス変異株を同定し、ヘキソンをコードする遺伝子の一部の塩基配列を解読、標準株と比較検討し進化系統樹を作製する。さらにヘキソンと並ぶ血清型の抗原決定基であるファイバー領域についても同様に進化系統樹を作製することにより、血清型の同定を試みる。これまで蓄積された疫学データを元に、流行と関連性のある起因ウイルス DNA の epitope を検討する。現在までの結果ヘキソンおよびファイバーについての調査が一部終了しているが、他部位についても、より詳細に検討する。さらに AdV 結膜炎の拡大予防の一環として、ウイルス自体の性状について、その抵抗性などを再検討する。また、韓国、中国、バングラデシュなどの近隣諸国およびトルコ、サウジアラビアの疫学的調査を行う。

(3) 新規抗酸化療法の開発

アスタキサンチンはカロテノイド類のキサントフィルに属し、主にエビ・カニなど甲殻類、サケ・マス、タイ・コイの表皮などに含まれる天然色素の一種である。ルテインの 3.5 倍の抗酸化作用をもつと同時に、プレドニゾロンと同等の抗酸化作用も示すことを我々は示してきた。今後の臨床応用を検討する上で、健常人における脈絡膜血流に及ぼす効果について検討をおこなう。

NF- κ B (nuclear factor- κ B) は生体内の組織に ubiquitous に存在し、細胞増殖・生存に必要な細胞内情報の伝達に関与する。通常、抑制分子である I κ B (inhibitor of κ B) と結合した状態で細胞質中に存在するが、種々の刺激によってリン酸化され核内へ移行し、サイトカイン産生、細胞増殖、アポトーシス等に関わる遺伝子の転写を活性化する。DHMEQ (dehydroxy methyl epoxyquinomicin) は微生物の 2 次代謝産物から弱い抗菌物質として発見されたエポキシキノマイシン (epoxyquinomicin) の骨格を元に分子デザインされた新たな低分子の NF- κ B 阻害薬である。ヒト内因性ぶどう膜炎の動物モデルである実験的自己免疫性ぶどう膜炎 (experimental autoimmune uveoretinitis ; EAU) を用いて、NF- κ B 阻害薬である DHMEQ が治療薬として有効であるか検討する。

4. 研究成果

(1) 疾患感受性遺伝子の発見・同定

約 3 万個のマイクロサテライトを用いた全ゲノム網羅的遺伝子解析をベーチェット病に対して行い日本人で toll like receptor (TLR) 4 遺伝子が新しい疾患感受性遺伝子の

一つであることを発見し (Ann Rheum Dis 2008;67:725-727)、その結果の再現性を韓国人ベーチェット病患者でも確認した (Rheumatol 2009;48: 638-642)。トルコ人ベーチェット病においても TLR4 遺伝子の多型と疾患感受性についてデータを解析中である。またこのマイクロサテライトでの全ゲノム網羅的解析の中で HLA-A, B, C, E, F, G についてさらに詳細な解析を行い HLA-A*26 が HLA-B*51 陰性者で有意に多くみられることを確認した (Ann Rheum Dis. 2010; 69:747-54)。

また難治性内眼炎である原田病に対して 200 例程度の日本人検体を用い PTPN22 遺伝子 (Molecular Vision 2009; 15:1115- 1119) や NALP1 遺伝子 (現在投稿中) について病態との関係を明らかにした。

マイクロアレイチップを用いたベーチェット病の全ゲノム網羅的 SNP 解析を横浜市立大学眼科、東海大学分子生命科学分野と共同研究の上、相関解析を行い 2 つの新規疾患感受性遺伝子を見出した。この結果は現在トルコ人、ギリシャ人、韓国人などの他民族との比較を行い海外有力雑誌に投稿中である。

(2) ウイルス性眼疾患における分子疫学的検討

ヒトアデノウイルス (HAdV) のヘキソンおよびファイバー領域の塩基配列を解析し、我々は世界で初めての新型ヒトアデノウイルスを 2 種類発見した。それらは 2009 年の国際ウイルス学会アデノウイルスワークショップ (ハンガリー: ブダペスト) でそれぞれ 53 型、54 型という新名称が付けられた。現在、これら新型ウイルスの遺伝子解析結果を基盤とした新規治療薬の開発に取り組んでいる。

臨床症状の原因となる HAdV 遺伝子はいまだ特定されていないが、ヘキソン領域の sequence 解析によって中和の epitope 領域はかなり絞られてきた。これにより今後治療薬やワクチンの開発に期待が寄せられる。

(3) 新規抗酸化療法の開発

カロテノイドであるアスタキサンチンをボランティアに経口投与し、眼底の脈絡膜循環への改善効果を LSFG (laser speckle flow graphy) を用いて測定した。2 重盲検試験を用い、プラセボ群と比較した結果、摂取開始 2 週間後にアスタキサンチン 12mg 摂取群でプラセボ群に対して有意に黄斑部の脈絡膜循環の指標となる SBR (square blur rate) 値の改善がみられた (Wilcoxon signed rank test, P=0.0443)。4 週間の摂取で、血清学的・医学的な副作用はみられなかった。脈絡膜血流量の増加が見られ、脈絡膜炎や内眼炎治療への応用が期待できることが示唆された。

また、新たな NF- κ B 阻害薬である dehydroxy methyl epoxyquinomicin (DHMEQ) を投与することによりマウスに誘導した実

験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎が治療群で発症は遅延し ($P < 0.01$)、組織学的な重症度は軽症化した ($P < 0.05$)。T 細胞増殖反応は DHMEQ 添加により抑制された。また T 細胞、抗原提示細胞を DHMEQ で前処理した場合、いずれも増殖は抑制されたが、T 細胞の前処理でより強い増殖抑制効果がみられた。さらに治療群では網膜での NF- κ B p65 核内転送が抑制された。DHMEQ 投与により実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎の発症遅延および病態の軽症化が示され、その機序として主に T 細胞に作用して T 細胞増殖反応を抑制し、眼局所では NF- κ B 核内転送の抑制によることを明らかにした。これらの結果から NF- κ B 阻害薬は、ヒト内因性ぶどう膜炎の新たな治療戦略になり得ると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 52 件)

- ① Asukata Y, Ota M, Meguro A, Katsuyama Y, Ishihara M, Namba K, Kitaichi N, Morimoto S, Kaburaki T, Ando Y, Takenaka S, Inoko H, Ohno S, Mizuki N, Lack of association between toll-like receptor 4 gene polymorphisms and sarcoidosis-related uveitis in Japan, *Mol Vis*, 査読有、VOL. 15、2009、pp. 14-20
- ② Horie Y, Kitaichi N, Katsuyama Y, Yoshida K, Miura T, Ota M, Asukata Y, Inoko H, Mizuki N, Ishida S, Ohno S, Evaluation of PTPN22 polymorphisms and Vogt-Koyanagi-Harada disease in Japanese patients, *Mol Vis*, 査読有、VOL. 15、2009、pp. 1115-1119
- ③ Horie Y, Neguro A Ota M, Kitaichi N, Katsuyama Y, Takemoto Y, Namba K, Yoshida K, Song Y W, Park K S, Lee E B, Inoko H, Mizuki N, Ohno S, Association of TLR4 polymorphisms with Behcet's disease in a Korean population, *Rheumatology*, 2009、査読有、VOL. 48、2009、pp. 638-642
- ④ Kamio M, Meguro A, Ota M, Nomura N, Kashiwagi K, Mabuchi F, Iijima H, Kawase K, Yamamoto T, Nakamura M, Negi A, Sagara T, Nishida T, Inatani M, Tanihara H, Aihara M, Araie M, Fukuchi T, Abe H, Higashide T, Sugiyama K, Kanamoto T, Kiuchi Y, Iwase A, Ohno S, Inoko H, Mizuki N, Investigation of the association between the GLC3A locus and normal tension glaucoma in Japanese patients by microsatellite analysis, *Clin Ophthalmol*, 査読有、VOL. 3、2009、pp. 183-188
- ⑤ Kase S, Saito W, Ohno S, Ishida S, Proliferative diabetic retinopathy with lymphocyte-rich epiretinal membrane associated with poor visual prognosis, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 査読有、VOL. 50、2009、pp. 5909-5912
- ⑥ Kitaichi N, Miyazaki A, Stanford MR, Iwata D, Chams H, Ohno S, Low prevalence of juvenile-onset Behcet's disease with uveitis in east/south Asian people, *Br J Ophthalmol*, 査読有、VOL. 93、2009、pp. 1428-1430
- ⑦ Kitamei H, Kitaichi N, Namba K, Kotake S, Goda C, Kitamura M, Miyazaki A, Ohno S, Clinical features of intraocular inflammation in Hokkaido, Japan, *Acta Ophthalmol*, 査読有、VOL. 87、2009、pp. 424-428
- ⑧ 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*, 査読有、VOL. 3、2009、pp. 307-312
- ⑨ Nishizaki R, Ota M, Inoko H, Meguro A, Shiota T, Okada E, Mok J, Oka A, Ohno S, Mizuki N, New susceptibility locus for high myopia is linked to the uromodulin-like 1 (UMODL1) gene region on chromosome 21q22.3, *Eye*, 査読有、VOL. 23、2009、pp. 222-229
- ⑩ Tomiyama R, Meguro A, Ota M, Katsuyama Y, Nishide T, Uemoto R, Iijima Y, Ohno S, Inoko H, Mizuki N, Investigation of the association between toll-like receptor 2 gene polymorphisms and Behcet's disease in Japanese patients, 査読有、VOL. 70、2009、pp. 41-44
- ⑪ Miyazaki A, Kitaichi N, Ohgami K, Iwata D, Jin XH, Iwabuchi K, Morohashi T, Ohno S, Onoe K, Anti-inflammatory effect of angiotensin type 1 receptor antagonist on endotoxin-induced uveitis in rats, *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 査読有、VOL. 246、2008、pp. 747-757
- ⑫ Asukata Y, Ishihara M, Hasumi Y, Nakamura S, Hayashi K, Ohno S, Mizuki

- N, Guidelines for the diagnosis of ocular sarcoidosis, Ocul Immunol Inflamm, 査読有、VOL. 16、2008、pp. 77-81
- ⑬ Horie Y, Namba K, Kitaichi N, Ohno S, Sister cases of Behcet's disease and Vogt-Koyanagi-Harada disease, Br J Ophthalmol, 査読有、VOL. 92、2008、pp. 433-434
- ⑭ Kaneko H, Kawana T, Ishioka K, Ohno S, Aoki K, Suzutani T, Evaluation of mixed infection cases with both herpes simplex virus types 1 and 2, J Med Virology, 査読有、VOL. 80、2008、pp. 883-887
- ⑮ Horie Y, Namba K, Kitaichi N, Ohno S, Sister cases of Behcet's disease and Vogt-Koyanagi-Harada disease, Br J Ophthalmol, 査読有、VOL. 92、2008、pp. 433-434
- ⑯ Horie Y, Kitaichi N, Takemoto Y, Namba K, Yoshida K, Hirose S, Hasumi Y, Ota M, Inoko H, Mizuki N, Ohno S, Polymorphism of IFN-gamma gene and Vogt-Koyanagi-Harada disease, Mol Vis, 査読有、VOL. 92、2008、pp. 2334-2338
- ⑰ Horie Y, Saito W, Kase S, Yoshida K, Ohno S, Primary central nervous system lymphoma with intraocular recurrence after optic nerve disorder, Retinal Cases & Brief Reports, 査読有、VOL. 1、2007、pp. 165-168
- ⑱ Ito A, Ota M, Katsuyama Y, Inoko H, Ohno S, Mizuki N, Lack of Association of Toll-like receptor 9 gene polymorphism with Behcet's disease in Japanese patients, Tissue Antigens, 査読有、VOL. 70、2007、pp. 423-426

[学会発表] (計 84 件)

- ① Ohno S, Ocular Inflammatory Disease: Clinical pictures of sarcoidosis. The 12th Seoul National University-Hokkaido University Joint Symposium: Seoul, Korea; 2009/11/19
- ② Ohno S, Namba K, Kitaichi N, Ishida S. Clinical features of intraocular inflammation in Asia-Pacific region. The 4th Congress of the Asia-Pacific Vitreo-Retinal Society: Taipei, Taiwan; 2009/11/12
- ③ Ohno S, Kitaichi N, Namba K. Intraocular inflammation in Asia. The 2nd International Uveitis/ The 3rd Asia Pacific Intraocular Inflammation/The 8th Chinese Ocular Immunology Combined Symposium:

Chongqing, China; 2009/11/6

- ④ Kitaichi N, Ohno S. Young Investigator Award Lecture: Low prevalence of juvenile-onset Behcet's disease with uveitis in east/south Asian people. The 2nd International Uveitis Symposium/ The 3rd Asia-Pacific Intraocular Inflammation Symposium/ The 8th Chinese Ocular Immunology Symposium: Chongqing, China; 2009/11/6
- ⑤ Ohno S, Lennikov A. Clinical features of Behcet's disease. Meeting in Research Institution of Rheumatology Diseases: Moscow, Russia; 2009/9/15
- ⑥ Ohno S. Vogt-Koyanagi-Harada disease. SOE 2009: The 17th Congress of the European Society of Ophthalmology: Amsterdam, The Netherlands; 2009/6/13
- ⑦ Ohno S, Hirose S, Kitaichi N. Early systemic corticosteroid therapy may reduce ocular complications in Vogt-Koyanagi-Harada disease. The 6th International Workshop on Vogt-Koyanagi-Harada disease & sympathetic ophthalmia/ The 2nd International workshop on Sarcoidosis, Singapore, Singapore; 2009/2/28
- ⑧ Ohno S, Kitaichi N. Diagnosis of Vogt-Koyanagi-Harada disease. The 6th International Workshop on Vogt-Koyanagi-Harada disease & sympathetic ophthalmia/ The 2nd International workshop on Sarcoidosis, Singapore, Singapore; 2009/2/27

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大野 重昭 (OHNO SHIGEAKI)

北海道大学・大学院医学研究科・特任教授
研究者番号：50002382

(2) 研究分担者

石田 晋 (ISHIDA SUSUMU)

北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：10245558

(H21 より分担研究者)

吉田 和彦 (YOSHIDA KAZUHIKO)

北海道大学・北海道大学病院・講師
研究者番号：90281807

南場 研一 (NAMBA KENICHI)

北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号：70333599

北市 伸義 (KITAICHI NOBUYOSHI)

北海道大学・北海道大学病院・助教

研究者番号：40431366

(H21より分担研究者)

田川 義継 (TAGAWA YOSHITSUGU)

北海道大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：40109426

(H19～H20：分担研究者)

小野江 和則 (ONOE KAZUNORI)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授

研究者番号：40002117

(H19～H20：分担研究者)

(3)連携研究者

水木 信久 (MIZUKI NOBUHISA)

横浜市立大学・医学部・教授

研究者番号：90336579

(H20：分担研究者から変更)

猪子 英俊 (INOKO HIDETOSHI)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：10101932

(H20：分担研究者から変更)