

機関番号：10101

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2010

課題番号：19592003

研究課題名 (和文) 難治性内因性ぶどう膜炎再発機序に関する分子遺伝学的検討

研究課題名 (英文) Molecular genetic analysis of recurrence of endogenous uveitis

研究代表者

北市 伸義 (KITAICHI NOBUYOSHI)

北海道大学・大学院医学研究科・客員准教授

研究者番号：40431366

研究成果の概要 (和文)：本研究ではぶどう膜炎における疾患感受性遺伝子や再発など予後に影響を与える遺伝子を探索した。まず世界 14 カ国 25 施設のベーチェット病臨床像をまとめ、地域による症状や予後の違いを明らかにした。日本では同病の視力予後は依然として不良で、小児発症例が少ないことも明らかとなった。並行して各国からベーチェット病や原田病、尋常性白斑などの遺伝子サンプルを収集・検討し、ベーチェット病と原田病の間で再発に関与すると考えられる遺伝子に差異が見られた。

研究成果の概要 (英文)： Disease susceptibility genes and prognostic factors of endogenous uveitis were examined in this project. First, descriptive questionnaires were collected from 25 eye centers in 14 countries. Behcet disease is still a common cause of blindness in Asia. It was less common in children than in adults in East/South Asian countries.

Second, DNA samples were collected to analyze molecular genetic factors associated with clinical characteristics and prognostic factors of uveitic diseases. Some gene polymorphisms were associated with the diseases: Behcet disease, sarcoidosis, Vogt-Koyanagi-Harada disease, and vitiligo vulgaris. Polymorphisms expected to the recurrence of uveitis was analyzed in Behcet disease compared with Vogt-Koyanagi-Harada disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：遺伝子、免疫学、臨床遺伝子、分子遺伝学、臨床、ベーチェット病、

Vogt-小柳-原田病

1. 研究開始当初の背景

| ーぶどう膜炎が「再発する」ことを考えるー

今日多くの自己免疫性疾患が知られているが、その根本的予防法・治療法は確立されていない。眼科領域におけるベーチェット病、サルコイドーシス、原田病を初めとする内因性ぶどう膜炎もその一つである。特にベーチェット病は20-30歳代に発症する失明率の高い難病であり、いわゆる働き盛りの発病・失明は本人にとってはもちろん、社会的にも大きな問題である。

現在多くの自己免疫疾患に対して副腎皮質ステロイド薬や免疫抑制薬が使用されているが、急性期炎症から回復した後も「維持療法」として治療薬剤を長期間継続している。実はこの段階での副作用発現・発作の再発が多い。

一方で難治性ぶどう膜炎においても一度の眼発作で失明に至ることは少なく、多くは複数回の眼発作の再発・遷延化により失明に至る。従って初回発作をコントロールすることはもちろん重要であるが、むしろそれ以上に長期的に副作用なく**再発をコントロール**することの方が臨床的に望まれている。

申請者はこれまでの眼科医としての経験から以下の4つの疑問を抱いた。

① ぶどう膜炎の初回発作時と再発時は同じ治療でよいのか？

② 何種類もの神経ペプチドが前房水内に存在するのはなぜか？

③ T細胞は常にぶどう膜炎を悪化させる存在なのか？

④ ぶどう膜炎を再発する患者としない患者は何が異なるのか？

最近の我々の研究によると、①の答えとして将来的には異なる治療法が開発されるべきだと考える。その場合、制御性T細胞が中心的な役割を果たし、その誘導には眼とアルファメラノサイト刺激ホルモン (α -MSH) が必須である。皮膚の日焼けで知られる α -MSH は前房水内に豊富に存在するが、眼内での役割はこれまで不明であった。これが②の答えの一つと考えられる。

一方、他の前房水内ペプチドであるトロンボスポンジンやマクロファージ遊走阻止因子 (MIF) は逆にぶどう膜炎を悪化させ、これはヒトでも当てはまる。さらに、これまでの眼免疫学の常識ではT細胞はぶどう膜炎を悪化させると信じられてきたが、③に対する答えは「否」であることも報告した。ぶどう膜炎回復後に脾臓内にユニークな抗原特異的免疫制御 CD4 (+) T細胞がメラノコルチン5受容体 (MC5r) からのシグナルを介して誘導される。この細胞集団をある条件下で活性化して他の同系マウスに養子移入するとマウスのぶどう膜炎を抑制できるが、ただし免疫前・ぶどう膜炎経験前にはみられない。しかも我々の発見したこの制御性T細胞集団の活性は非常に高く、多発性硬化症 (MS)

や1型糖尿病への応用、さらにはこれまで世界の誰も成功していない同種異系 (アロ) 網膜移植成功の可能性もでてきた。網膜は中枢神経系の一部とされ、その移植はこれまで夢の治療と考えられてきた。

2. 研究の目的

前述の最後の疑問④は臨床現場で最も重要な点＝クライマックスであり、本研究計画はまさにここを検討する。すなわち、この新たな免疫機構、 α -MSH 関連制御性 T細胞の誘導・活性化機序の知見 (①、②、③) をヒトで分子遺伝学的に検討すること (④) である。

3. 研究の方法

(1) 検体収集と臨床経過の把握

DNA を採取するとともに、十分な臨床経過を把握することが鍵となる。疾患としてみればベーチェット病は95%以上が再発性であり、一方原田病やサルコイドーシスはその多くが単発性である。今回のプロジェクトでは再発しやすい「疾患」の感受性に関わる遺伝子を探るという切り口と、再発しやすい「個体」の遺伝子背景を明らかにするという切り口があり、膨大な症例の臨床経過を事前に確実に把握することが必要となる。地味な作業であるが、この作業が最終結果を左右するポイントであり、世界規模の調査を行う。

(2) 点突然変異、多型頻度の検討

各民族の健常者における様々な遺伝子多型頻度がインターネットで公開されている。 α -MSH に関連する MC5R 遺伝子コード領域と炎症性サイトカインである MIF, IFN- γ の全配列の中からぶどう膜炎患者にのみみられる点突然変異、あるいはぶどう膜炎が再発した患者にのみみられる点突然変異を探す。

しかし、疾患特異的、あるいは再発性ぶどう膜炎のみにみられる点突然変異は存在しない可能性もある。その際はやはり既に公開されている健常者の当該部分遺伝子多型との出現頻度を比較する。

＝具体的解析方法＝

1. MC5R 領域ダイレクトシーケンス法

- ① 十分なインフォームドコンセントのもと血液を採取。
- ② 血液から DAN 抽出キットを用いて DNA を抽出。
- ③ Direct Sequence を行うため PCR には Nested PCR 法を用いる。
- ④ 1st PCR は以下の Primer を用いる。
Forward Primer GAGAGAGAAGATCGCTTGTG,
Reverse Primer GAGTCACAGAGTCTCCACAG。
- ⑤ 上記④PCR産物を用いて 2nd PCR を以下の Primer を用いて行う。Forward Primer

TCTAGGCTAGCTGCTGTCTT, Reverse Primer
GAACAGAGAGAGCCTCTTAGG.

- ⑥ 上記⑤PCR産物を BigDye Terminator v3.1 を用いてシーケンス反応を行う。(Applied Biosystems, Foster CA)。
- ⑦ 上記⑥産物はエタノール沈殿後、DNA解析装置 (ABI3130 Genetic Analyzer) を用いて **Direct Sequence** を行う (Applied Biosystems, Foster CA)。
- ⑧ Sequencing Analysis v5.2 ソフトを用いて1塩基ずつ塩基配列を解析する。(Applied Biosystems, Foster CA)。
- ⑨ 健常人、患者群にかかわらず新たに塩基配列を確認した場合はその結果を報告し **GeneBank (ヒトゲノムのデータベース) に登録する**。
- ⑩ MC5R 遺伝子は現在アミノ酸変異を伴う2つの Single Nucleotide Polymorphism (SNP) が報告されている。
- ⑪ Direct Sequence で得た **上記2つの SNP について患者群、健常人でその頻度に差があるか比較する**。両群の比較には χ^2 乗検定を用いる。
- ⑫ P 値が 0.05 以下をもって「有意差あり」と判断する。

2. インターフェロン・ガンマ (IFN- γ) 領域マイクロサテライト法

- ① 十分なインフォームドコンセントのもと血液を採取。
- ② 血液から DAN 抽出キットを用いて DNA を抽出。
- ③ 蛍光色素 (FAM) を付着させた Primer を用いて PCR を行う。Primer は Forward Primer GCTGTCATAATATTCAGAC、Reverse Primer CGAGCTTTAAAGATAGTCC。
- ④ PCR 産物は DNA 解析装置 ABI3130 Genetic Analyzer を用いて Fragment 解析、microsatellite の反復回数を解析。(Applied Biosystems, Foster CA)
- ⑤ 解析結果は GeneMapper ソフトを用いてデータ解析を行う。(Applied Biosystems, Foster CA)
- ⑥ **患者群と健常者群で microsatellite の反復回数に有意差がないか χ^2 乗検定、あるいは Fisher 検定を行う**。また Bonferroni 補正に従い P 値を補正し P_c 値を求める。
- ⑦ P_c 値が 0.05 以下をもって「有意差あり」と判断する。

同様の手順で HLA-B*51、NLRP1 遺伝子、Toll-like receptor (TLR)-2、TLR-4、IL-23R、IL-10、PTPN22、CARD15 等の遺伝子を検討した。

4. 研究成果

(1) 臨床検体収集と臨床像の検討成果

- ① 世界 14 カ国 25 施設が参加したベーチェット病大規模国際調査を主導し、解析した。臨床像や重症度には明らかな地域差・民族差があり、日本は比較的軽症状の重篤な民族であった。また、小児での発症率がヨーロッパ人や中東アラブ人に比較してアジア人で非常に低いことも明らかになった。全体では外陰部潰瘍の発症率が小児では成人発症例より低頻度であり、小児発症例と成人発症例間でも臨床像が異なる可能性が初めて示唆された。
- ② 原田病では、発症早期に全身ステロイド薬治療を開始すると、ステロイド薬の総投与期間が短縮できることが明らかになった。
- ③ 当施設ではぶどう膜炎の原因疾患として最も多いのはサルコイドーシス、続いて原田病、ベーチェット病の順であった。サルコイドーシスとベーチェット病では男性の方が平均発症年齢は若いことが明らかになった。

◇ 特にベーチェット病大規模国際疫学調査は史上最大規模のものであり、国際的に高い評価を得て多くの受賞対象となった。今後さらに今回参加しなかった国の施設にも参加を呼びかけ、臨床像を明らかにするよう努めたい。

(2) 分子遺伝学的成果

- ① HLA-B*51 遺伝子: ベーチェット病では各民族に普遍的に HLA-B*510101 が強い関連を示した。
- ② IL-23R/IL-12RB2、IL-10 遺伝子: 従来知られている HLA-Class I 以外のベーチェット病疾患関連遺伝子であることが明らかになった。
- ③ TLR-4 遺伝子 (ベーチェット病): 韓国人ベーチェット病患者の DNA で遺伝子多型がみられ、発症リスクが高くなることが明らかになった。
- ④ IFN- γ 遺伝子: 原田病との関連性がみられる一塩基多型とリピート数が明らかになった。
- ⑤ TLR-2 遺伝子: 日本人ではサルコイドーシスとの関連はみられなかった。
- ⑥ NLRP1 遺伝子: 尋常性白斑では関連が指摘されているが、同様に皮膚白斑をきたす原田病では関連がみられなかった。
- ⑦ TLR-4 遺伝子 (サルコイドーシス): 日本人ではサルコイドーシスぶどう膜炎との関連はみられなかった。
- ⑧ PTPN22 遺伝子: 日本人原田病で遺伝子多型はみられなかった。
- ⑨ CARD15 遺伝子: サルコイドーシスとの関連はみられなかった。

◇ 遺伝子多型は類似疾患間でも異なる結果が得られ、また対象民族によって結果が異なることがあった。これらは臨床像が似ていても発症機序が異なる疾患があること、逆に同一疾患であっても民族によって遺伝子背景が異なることがあることを示す、大きな成果である。

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 86 件、英 34 / 邦 52)

(1) Mizuki N, Meguro A, Ota M, Ohno S (4 番目), … Kitaichi N (13 番目), Namba K (14 番目) ……(総員数 21): Genome-wide association studies identify IL23R/IL12RB2 and IL10 as Behcet's disease susceptibility loci. *Nat Genet* 42: 703-706, 2010、査読有

(2) Horie Y, Meguro A, Ota M, Kitaichi N (4 番目), …Namba K (7 番目), …Ohno S (最終著者) (総員数 14): Association of TLR4 polymorphism with Behcet disease in Korean population. *Rheumatology* 48: 638-642, 2009、査読有

(3) 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* 93: 1428-1430, 2009、査読有

(4) Taylor AW, Kitaichi N: The diminishment of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) by neuropeptide alpha-melanocyte stimulating hormone (α -MSH) therapy. *Brain Behav Immun* 22: 639-646, 2008、査読有

[学会発表] (計 57 件 招待 39 / 一般 18)

(1) Kitaichi N: Clinical features of uveitis with Behcet disease and the new therapeutic approach in the animal model. International Uveitis Study Group (IUSG) Meeting, Berlin, Germany, 2010/6/6 (招待審査講演)

(2) Kitaichi N: Low prevalence of juvenile-onset Behcet disease with uveitis in East/South Asian people. 2nd International Uveitis & 3rd Asia-Pacific Intraocular Inflammation Symposium,

Chongqing, China, 2009/11/6 (受賞記念招待講演)

(3) Kitaichi N: Infectious uveitis and intraocular inflammation. 24th Congress of Asia-Pacific Academy of Ophthalmology (APAO) and American Academy of Ophthalmology (AAO) Joint Meeting, Bali, Indonesia, 2009/5/19 (招待講演)

[図書] (計 13 件)

(1) 大野重昭、北市伸義: 文光堂 眼疾患の謎. Behcet 病はなぜシルクロード沿いの諸民族に多発するのか 137-139, 2010

(2) Kitaichi N, Ohno S: Lippincott Williams & Wilkins Co (USA). *Int Ophthalmol Clin* 48, Behcet disease in children. 87-91, 2008

(3) 北市伸義: 文光堂 眼科プラクティス 23 眼科薬物治療 A to Z. Vogt-小柳-原田病・交感性眼炎 136-138, 2008

ほか

[その他]

本研究期間における国際的受賞歴

(1) BioMedLib トップ 10 論文賞 (アメリカ・バージニア州、2011 年 3 月)

(2) アジア太平洋内眼炎症学会若手研究者賞 (開催地: 中国・重慶、事務局: シンガポール、2009 年 11 月)

(3) アメリカ視覚眼科学研究協会 (ARVO) アルコン研究賞 (開催地: アメリカ・フロリダ州、事務局: アメリカ・メリーランド州、2009 年 5 月)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北市 伸義 (KITAICHI NOBUYOSHI)

北海道大学・大学院医学研究科・客員准教授
研究者番号: 40431366

(2) 研究分担者

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

南場 研一 (NAMBA KENICHI)

北海道大学・北海道大学病院・講師

研究者番号: 70333599

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 (H19-H21)

大神 一浩 (OHGAMI KAZUHIRO)

北海道大学・大学院医学研究科・客員研究員

研究者番号: 80443977 (H19-H20)

(3) 連携研究者
なし