

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：22701

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2010～2014

課題番号：22133010

研究課題名(和文) ベーチェット病などのHLA関連遺伝性眼疾患における疾患特異的な多型の網羅的探索

研究課題名(英文) Identification of susceptibility genes for HLA-associated diseases including Behcet's disease

研究代表者

水木 信久(Mizuki, Nobuhisa)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90336579

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 45,700,000円

研究成果の概要(和文)：ベーチェット病を対象としたゲノム解析により、HLAクラスI分子に提示前のペプチドのトリミングに關与するERAP1(endoplasmic reticulum aminopeptidase 1)が、ベーチェット病の発症リスクに対して、ベーチェット病の強力な遺伝要因であるHLA-B*51と遺伝子間相互作用を示すことを見出した。サルコイドーシスを対象としたゲノム解析では、日本人のサルコイドーシス患者と相関を示すHLA-DRB1アリルおよびHLA-DQB1アリルを明らかにしたとともに、HLA-DRB1およびHLA-DQB1の近傍に位置するBTNL2遺伝子と疾患の相関性も明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 (ERAP1) is centrally involved in peptide trimming before HLA class I presentation. This study found that ERAP1 polymorphisms are associated with Behcet's disease and that also identified evidence of a gene-gene interaction between HLA-B*51 and ERAP1 in the disease. This study showed associations between certain HLA-DRB1/HLA-DQB1 alleles and sarcoidosis in a Japanese population. In addition, We found an association between BTNL2, located in close proximity to HLA-DRB1 and HLA-DQB1, and also clarified whether the BTNL2 association is independent of the HLA risk alleles.

研究分野：眼科学

キーワード：HLA関連遺伝性眼疾患 ベーチェット病 サルコイドーシス 原田病

1. 研究開始当初の背景

(1) 多くの遺伝性眼疾患において、HLA (Human Leukocyte Antigen: ヒト白血球抗原) 領域との有意な相関が報告されている。HLA 分子自体が疾患感受性を規定している可能性と、HLA 遺伝子は単なるマーカーで HLA 遺伝子の近傍の非 HLA 遺伝子が疾患感受性に関係している可能性が考えられる。本研究の対象疾患であるベーチェット病、サルコイドーシス、原田病 (フォークト・小柳・原田病) についても人種を問わず HLA との顕著な相関が報告されており、各々の疾患の発症に HLA 遺伝子が深く関与していることは疑いない (ベーチェット病: HLA-B*51、サルコイドーシス: HLA-DR アリル (DR3, DR5, DR6, DR8)、原田病: HLA-DRB1*0405)。

(2) 近年各々の疾患を対象に、相関を示す既知の HLA アリルとその近傍領域について詳細な解析が進められ、疾患と有意に相関する他の HLA 遺伝子または新たな非 HLA 遺伝子が同定されている (Proc Natl Acad Sci USA 1997;94(4):1298-1303. Am J Hum Genet 1999;64(5):1406-1410. Nat Genet 2005;37(4):357-364. Ann Rheum Dis 2010;69(4):747-754.)。しかしながら、HLA は高度の多型性を示すとともに、強固な連鎖不平衡を有するため、疾患と真に相関する HLA 遺伝子あるいは非 HLA 遺伝子は未だ確定されていない。

(3) また、HLA は人種による遺伝子頻度の多様性も示すことから、疾患と HLA の相関に人種差が認められる場合も報告されている。

(4) ベーチェット病、サルコイドーシスおよび原田病の病態は未だ明確ではないものの、これら自己免疫性の疾患と相関する特定の HLA 分子を有する患者では、その HLA 分子と自己ペプチドの複合体に対して T 細胞が完全な免疫寛容を獲得しておらず、自己免疫性 T 細胞クローンが残存し、何らかの誘因でそれが活性化されることで自己免疫疾患を発症すると推測される。誘因として先行感染が注目されており、微生物由来の抗原と自己抗原の間に類似のアミノ酸配列があり T 細胞が交差反応を起こすことによって自己反応性 T 細胞が活性化されるという molecular mimicry 説を示唆する報告がある。

(5) したがって、HLA 関連遺伝性眼疾患であるベーチェット病、サルコイドーシスおよび原田病の病態を解明する上で、各々の疾患の真の疾患感受性 HLA 遺伝子あるいは非 HLA 遺伝子を確定することは必須であり、確定した遺伝情報をもとに、病因遺伝子と結合する病因ペプチドの検索およびその病因ペプチドの結合阻止分子の同定を行うこと

で、各々の疾患を対象とした HLA 分子標的薬の開発を可能にし、HLA 関連遺伝性眼疾患の根治治療への道を拓くことが期待される。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、HLA 関連遺伝性眼疾患であるベーチェット病、サルコイドーシスおよび原田病を対象に、HLA 領域内の真の疾患感受性 HLA 遺伝子あるいは非 HLA 遺伝子を同定することである。

(2) さらに本研究では、同定した病因 HLA 分子と結合するペプチドの検索およびその病因ペプチドの結合阻止分子の同定も試みる。

(3) これらの成果は HLA 関連遺伝性眼疾患の病態の解明につながるるとともに、HLA 分子標的薬の開発を可能にし、HLA 関連遺伝性眼疾患の根治治療への道を拓くことを可能にする。

3. 研究の方法

(1) HLA 関連遺伝性眼疾患であるベーチェット病、サルコイドーシスおよび原田病を対象に、HLA 領域の網羅的な遺伝子多型解析を実行し、各々の疾患の真の疾患感受性 HLA 遺伝子あるいは非 HLA 遺伝子を網羅的に検索する。各疾患の患者および健常者を対象に、Illumina 社の DNA マイクロアレイまたは Life Technologies 社の TaqMan アッセイを用いて、遺伝子多型解析を実行する。各々の実験は、各社推奨のプロトコールに従って行う。

(2) 各々の疾患と真に相関する病因遺伝子の情報に基づいて、病因遺伝子に対する結合ペプチドおよび結合モチーフの検索をコンピューターを用いた解析 (*in silico* 解析) により実行する。

(3) さらに、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成ロボットによる自己抗体検出システムを用いて、各々の疾患を対象に自己抗体スクリーニングを系統的に実行し、各疾患の患者由来自己抗体の標的タンパク質を網羅的に検索する。

(4) また、各々の疾患の病因遺伝子を対象にした遺伝子改変マウス (トランスジェニックマウスおよびノックアウトマウス) の作製を行う。

4. 研究成果

(1) ベーチェット病を対象とした HLA 領域の詳細なゲノム解析により、HLA クラス I 分子に提示前のペプチドのトリミングに関与する ERAP1 (endoplasmic reticulum aminopeptidase 1) が、ベーチェット病の発

症リスクに対して、ベーチェット病の強力な遺伝的要因である HLA-B*51 アリルと遺伝子間相互作用 (gene-gene interaction) を示すことをトルコ人集団において見出した (Nat Genet 2013;45(2):202-207.)

(2) さらに、日本人集団において、ERAP1 と ERAP2 (endoplasmic reticulum aminopeptidase 2) の両方が、ベーチェット病の発症リスクに対して、HLA-B*51 アリルと遺伝子間相互作用を示す可能性を見出した (論文準備中)

(3) サルコイドーシスを対象とした HLA 領域の詳細なゲノム解析では、日本人のサルコイドーシス患者と相関を示す特定の HLA-DRB1 アリルおよび HLA-DQB1 アリルを明らかにした (Invest Ophthalmol Vis Sci 2012;53(11):7109-7115.)

(4) さらに、HLA-DRB1 および HLA-DQB1 の近傍に位置する BTNL2 (butyrophilin-like 2) 遺伝子とサルコイドーシスの相関性も明らかにした (Invest Ophthalmol Vis Sci 2012;53(11):7109-7115.)

(5) また、各疾患の病因 HLA 遺伝子を対象にしたトランスジェニックマウスおよびノックアウトマウスを構築するとともに、各疾患の病因 HLA 分子に結合するペプチド構造モチーフの情報および患者由来自己抗体の標的タンパク質の情報をもとに、病因 HLA 分子に結合する抗原ペプチド候補を絞り込んだ。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Bakir-Gungor B, Remmers EF, Meguro A, Mizuki N, Kastner DL, Gul A, Sezerman OU. Identification of possible pathogenic pathways in Behçet's disease using genome-wide association study data from two different populations. Eur J Hum Genet 2015;23(5):678-687. 査読有.
DOI: 10.1038/ejhg.2014.158.

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 Behçet disease. Proc Natl

Acad Sci U S A 2013;110(20):8134-8139. 査読有.

DOI: 10.1073/pnas.1306352110.

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. 査読有.

DOI: 10.3109/09273948.2012.756114.

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. 査読有.

DOI: 10.1038/ng.2520.

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. 査読有.

DOI:10.1136/annrheumdis-2011-20028.

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. 査読有.

DOI: 10.1167/iovs.12-10491.

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. 査読有.
<http://www.molvis.org/molvis/v18/a56/>

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. 査読有.
DOI: 10.1093/rheumatology/ker444.

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. 査読有.
DOI: 10.3109/09273948.2011.553981.

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. 査読有.
<http://www.molvis.org/molvis/v17/a83/>

〔学会発表〕(計 2 件)

Mizuki N. Genome-wide association study for Behcet's disease. Asia ARVO 2015、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市) 2015年2月17日.

Mizuki N. Epidemiology and Molecular Genetics of Behcet's Disease. World Ophthalmology Congress 2014、帝国ホテル(東京都千代田区) 2014年4月3日.

〔図書〕(計 3 件)

目黒 明、水木信久. ぶどう膜炎(ベージェット病、サルコイドーシス、原田病). *Retina Medicine* (先端医学社) 2014;3(1):38-43.

Meguro A, Mizuki N. Genetics. Behcet's Disease - From Genetics to Therapies (Springer) 2014, pp41-54.

Meguro A, Mizuki N, Gül A, Kitaichi N,

Ohno S. Behcet's syndrome according to classical and population genetics. Behcet's syndrome From pathogenesis to treatment of a rare disease (Springer) 2014, pp25-37.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

水木 信久 (MIZUKI, Nobuhisa)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号：90336579

(2)研究分担者

河越 龍方 (KAWAGOE, Tatsukata)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号：20564800

大野 重昭 (OHNO, Shigeaki)
北海道大学・医学研究科・名誉教授
研究者番号：50002382

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

目黒 明 (MEGURO, Akira)

竹内 正樹 (TAKEUCHI, Masaki)

Elaine F. Remmers (REMMERS, Elaine F.)