

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592940

研究課題名(和文)慢性再発性アフタの遺伝要因を決定するHLAアレルの連鎖解析

研究課題名(英文)Linkage study about HLA alleles of recurrent aphthous stomatitis

研究代表者

坂田 康彰(SAKATA, YASUAKI)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：50322425

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円、(間接経費) 660,000円

研究成果の概要(和文)：慢性再発性アフタ患者を含む家族27家系98人のDNAを抽出した。HLA-A、-B、-Cw、-DRB1において塩基配列レベルでアレルを特定した。各遺伝子のアレルにたいし、連鎖不平衡試験を実施した。HLA-CwおよびDRB1遺伝子座全体としては連鎖不平衡が認められた( $P=0.01$ ,  $P=0.03$ )。HLA-Cw\*0303が家系内の患者間で連鎖不平衡を有し、RAS発症において遺伝的関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We extracted the DNA of 27 families (98samples), including patients with recurrent aphthous stomatitis patients. We did the nucleotide sequence level typing on HLA-A,-B,-Cw,-DRB1 locus. We performed linkage study on each locus. Linkage disequilibrium was observed as DRB1 locus and the entire HLA-Cw ( $P=0.01$ ,  $P=0.03$ ). And It was suggested that HLA-Cw\*0303 has a significant association with recurrent aphthous stomatitis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：慢性再発性アフタ HLA 連鎖解析

## 1. 研究開始当初の背景

RAS は、口腔内に限局してアフタが比較的定期的に再発を繰り返す疾患で、10 日前後で自然治癒することが多いが、発症中は激しい疼痛を伴う疾患である。現在のところ原因は不明で、全人口の 20% 近くが本症に罹患しているものと考えられている。ところが、本症はこれほど頻度の高い疾患でありながら、根本的な治療法は確立しておらず、軟膏塗布や鎮痛剤などの対症療法が行われているのみで、しかも、そのほとんどが奏功しないため患者は痛みを耐えながら自然治癒を待っているのが現状である。これは、本症が、致死のあるいは重篤な状態に陥る疾患ではなく、一定期間後には自然治癒してしまうことから、原因の追究がなされていないためであると考えられる。しかしながら、発症した際の激痛は筆舌し難く、患者にとってその予防薬あるいは根本的な治療薬の開発は待望されている。日常の臨床においても、本症に対する従来の治療法には限界を感じている臨床家が多く、1 日も早い発症原因の解明と、新薬開発の必要性は高まってきている。

1983 年、Malmstrom らによって、本症と HLA 抗原との関連について報告されたことがある。これは患者群を研究対象として、HLA 抗原の陽性頻度と健常者のそれとを比較したものであるが、有意な関連性を指摘することはできなかった。しかしこの報告には問題点があり、当時の研究レベルでは、HLA 抗原を血清学的に分類するのみで、現在 200 種類以上確認されている遺伝子多型を 20 種類ほどにしか分類しておらず、HLA との関連性を否定する十分な研究とは言えない。現在は塩基配列レベルで解析することにより、日々新たに確認されている遺伝子多型を含めて分類可能である。われわれは、これまでの研究で HLA-Cw および HLA-DRB1 のいくつかの遺伝子多型が健常群にくらべ患者群において有意に増加していることを見出している (Sakata et al. Asian AOMS in print)。また、疾患の主動遺伝子を解析する手法としては、原因と思われる候補遺伝子について、その疾患家系の遺伝解析を行うことが最も有効とされているが、日本人に対し本症を対象とした遺伝解析はこれまで報告がなく、われわれが渉猟しうるかぎり本邦初の試みと思われる。

## 2. 研究の目的

慢性再発性アフタ (recurrent aphthous stomatitis; RAS) は口腔内にアフタが比較的定期的に再発を繰り返す疾患で本症の発症原因は不明とされている。本症は Behcet 病の初発症状としても知られており免疫機構の関与が疑われる。したがって、免疫系遺伝子群である HLA 遺伝子の関与が示唆されているが、家系調査に基づく連鎖解析によって日本人において RAS と HLA の関連を明らかにした研究はない。本研究は、RAS のフェノ

タイプとその HLA 遺伝子多型について連鎖解析を行い、HLA が遺伝要因として RAS の発症への関与を究明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 対象家系の選定

慢性再発性アフタにて埼玉医科大学口腔外科に通院中の患者の中から、問診等を参考にして高頻度罹患家系を選定し、その中から、本研究の趣旨を理解していただいた上で協力が得られ、かつ、より多くのサンプル数が採取可能な家系を選抜する。選択基準は、以下のとおりである。

過去 5 年間に年間平均 4 回以上孤立性アフタを発症する

対象は問診等を参考にして RAS 罹患者が複数存在しかつ非罹患者も存在する家系であることが望ましいが、患者本人以外、被験者に RAS 罹患者がいなくても構わない。

対象家系内では患者本人を含めた核家族が形成できる構成でサンプル (口腔粘膜) 採取が可能な家系。(患者本人 + 両親に可能であれば患者の兄弟姉妹のサンプル採取が可能あるいは患者本人 + 配偶者 + 少なくとも 1 人の子のサンプル採取が可能な家系)

### (2) サンプル収集と保存

サンプル収集は口腔粘膜の擦過により行う。収集したサンプル (口腔粘膜) は、速やかに DNA 抽出を行い -20 にて冷凍保存するが、サンプル採集後すぐに DNA 抽出ができない場合は、1 M DTT (dithiothreitol) ストック溶液を調整し、-20 にて冷凍保存する。

### (3) HLA 遺伝子解析

冷凍保存していた DNA を解凍し、PCR-SSOP (sequence specific oligonucleotide probing) 法にもとづいた xMAP 測定技術 (Luminex 社) により、HLA-class 領域の HLA-A, B, C および HLA class 領域の HLA-DRB1 についてタイピングを行う。xMAP 測定技術とは、フローサイトメトリーの要領でタイピングを行う方法である。遺伝子タイピングにあたっては、陽性反応を示したプローブの複雑な組み合わせにより解析を行う

### (4) 統計学的処理 (連鎖解析)

HLA-A, B, C, DRB1 の家系内での遺伝状況、および RAS の罹患状態を、TDT テストにより候補となる HLA アリルの RAS との関連について検討する。TDT テストは特殊な統計計算で一般の解析ソフトでは対応できないが、国際共同研究のオープンソースなプロジェクトで開発され、GNU GPL に従って公開、配布されている高機能な統計ソフトである「R」を使用する。この解析によって、これまでの研究で候補遺伝子と考えている HLA

アリルの RAS 発症への関与の有無が最終的に決定する。

#### 4. 研究成果

(1) HLA-A および HLA-B においては有意差の認められるアリルは存在しなかった。

(2) HLA-Cw\*0303 は、連鎖不平衡が認められた<P=0.03> (Table1)。

(3) HLA-DRB1\*0803 は、単独では連鎖不平衡は認められなかった (Table2)。

(4) HLA-Cw および DRB1 遺伝子座全体としては連鎖不平衡が認められた<P=0.01, P=0.03> (Table1, 2)。

(Table1)

HLA-Cw alleles	Samples		Comparisons		
	Ovs.	Exp.	Chi-sq.	P-val.	Pc-val.
Cw*0102	7	7.0	0.00	N.S.	N.S.
<b>Cw*0303</b>	<b>12</b>	<b>5.5</b>	<b>7.45</b>	<b>0.0033</b>	<b>0.03</b>
Cw*0304	8	5.5	2.27	N.S.	N.S.
Cw*0702	7	7.0	0.00	N.S.	N.S.
Cw*0801	3	3.5	0.14	N.S.	N.S.
Cw*1202	6	5.0	0.40	N.S.	N.S.
Cw*1402	3	3.0	0.00	N.S.	N.S.
Cw*1403	1	3.0	2.67	N.S.	N.S.
Others	3	5.5	2.27	N.S.	N.S.

Others: Cw\*0303, \*0305, \*0401, \*0803, \*1502

HLA-Cw座全体のP-val.=0.01

(Table2)

HLA-DRB1 alleles	Samples		Comparisons		
	Ovs.	Exp.	Chi-sq.	P-val.	Pc-val.
DRB1*0101	6	5.0	0.40	N.S.	N.S.
DRB1*0401	2	3.0	0.67	N.S.	N.S.
<b>DRB1*0803</b>	<b>10</b>	<b>5.0</b>	<b>3.60</b>	<b>0.0075</b>	<b>0.06</b>
DRB1*0901	3	3.5	0.14	N.S.	N.S.
DRB1*1302	0	3.5	2.70	N.S.	N.S.
DRB1*1501	3	3.5	0.14	N.S.	N.S.
DRB1*1502	4	3.0	0.67	N.S.	N.S.
Others	13	10.0	1.80	N.S.	N.S.

Others: DRB1\*0403, \*0405, \*0406, \*0407, \*0802, \*1101, \*1201, \*1202, \*1401, \*1403, \*1405, \*1406, \*1602

HLA-DRB1座全体のP-val.=0.03

また、RAS 発症に抑制的な遺伝要因として HLA アリルに着目し、RAS 患者家系内においてアフタが一度も発症したことがない者の各 HLA 遺伝子座の陽性率と健常日本人の陽性率とを遺伝統計学的に検討した。

(5) HLA-Cw では、Cw\*0302 がコントロール群に比べ対象群に有意に増加していた (Table3)

(Table3)

HLA-Cw alleles	Samples		Comparisons		
	N=21	N=117	P-value	Pc-value	
Cw*0102	7(16.7)	40(17.0)			N.S.
<b>Cw*0302</b>	<b>2(4.8)</b>	<b>0(0.0)</b>	<b>0.001</b>	<b>0.012</b>	
Cw*0303	6(14.3)	18(7.8)			N.S.
Cw*0304	3(7.1)	26(11.3)			N.S.
Cw*0401	0(0.0)	15(6.5)			N.S.
Cw*0602	0(0.0)	4(1.7)			N.S.
Cw*0702	3(7.1)	26(11.3)			N.S.
Cw*0704	0(0.0)	2(0.9)			N.S.
Cw*0801	6(14.1)	26(11.3)			N.S.
Cw*0803	2(4.8)	6(2.6)			N.S.
Cw*1202	6(14.3)	24(10.4)			N.S.
Cw*1402	3(7.1)	13(5.7)			N.S.
Cw*1403	1(2.4)	29(12.2)			N.S.
Cw*1502	3(7.1)	4(1.7)	0.04		N.S.

(6) HLA-B では、B\*5801 がコントロール群に比べ対象群に有意に増加していた (Table4)

(Table4)

HLA-B alleles	Samples		Comparisons		
	N=22	N=117	P-value	Pc-value	
B*0702	2(4.5)	12(5.2)			N.S.
B*1301	0(0.0)	3(1.3)			N.S.
B*1302	0(0.0)	1(0.4)			N.S.
B*1501	3(6.8)	15(6.5)			N.S.
B*1511	0(0.0)	1(0.4)			N.S.
B*1518	0(0.9)	4(1.7)			N.S.
B*3501	3(6.8)	18(7.8)			N.S.
B*3701	0(0.0)	3(1.3)			N.S.
B*3802	0(0.0)	1(0.4)			N.S.
B*3901	0(0.0)	8(3.5)			N.S.
B*3902	0(0.0)	2(0.9)			N.S.
B*4001	1(2.3)	14(6.1)			N.S.
B*4002	3(6.8)	14(6.1)			N.S.
B*4006	4(9.1)	11(4.8)			N.S.
B*4403	2(4.5)	29(12.2)			N.S.
B*4601	5(11.0)	14(6.1)			N.S.
B*4801	4(9.1)	10(4.3)			N.S.
B*5101	5(11.0)	16(7.0)			N.S.
B*5102	0(0.0)	1(0.4)			N.S.
B*5201	7(16.0)	24(10.4)			N.S.
B*5401	0(0.0)	16(7.0)			N.S.
B*5502	1(2.3)	5(2.2)			N.S.
B*5601	0(0.0)	3(1.3)			N.S.
<b>B*5801</b>	<b>2(4.5)</b>	<b>0(0.0)</b>	<b>0.002</b>	<b>0.04</b>	
B*5901	1(2.3)	2(0.9)			N.S.
B*6701	1(2.3)	4(1.7)			N.S.

(結論)

HLA-Cw\*0303 が、RAS 発症において、遺伝要因として関与している可能性が示唆された。

HLA-DRB1\*0803 は RAS 患者間での連鎖不平衡の傾向はみられたが、有意差を得るには至らなかった。

HLA-Cw および DRB1 遺伝子座 RAS 発症に関与するアリルが存在することが示唆された。

RAS 発症において、HLA-B\*5801, -Cw\*0302 陽性 C T L では抗原認識能が低下し、結果的に発症に際し抑制的に作用する可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 1 件)

Yasuaki Sakata, Yuichiro Enoki, Shoichiro Kokabu, Junya Nojima, Norimichi Nakamoto, Yosuke Fukushima, Tsuyoshi Sato, Tetsuya Yoda: **Possible presence of HLA alleles to inhibit the recurrent aphthous stomatitis onset**, Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine and Pathology 査読あり in print

DOI: 10.1016/j.ajoms.2013.11.010

(学会発表)(計 2 件)

坂田康彰、榎木祐一郎、中岡千恵里、古株彰一郎、佐藤 毅、野島淳也、福島洋介、依田哲也：慢性再発性アフタ(RAS)発症における遺伝要因としてのヒト白血球抗原(HLA)の関与 第 58 回日本口腔外科学会総会 福岡、2013.10.11-13

坂田康彰、榎木祐一郎、佐藤 毅、福島洋介、中本紀道、依田哲也：慢性再発性

アフタ(RAS)を抑制するヒト白血球抗原  
(HLA)アリルの存在の可能性 第 57 回  
日本口腔外科学会総会 横浜、  
2012.10.19-21

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
<http://www.saitama-med.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

坂田 康彰 (SAKATA YASUAKI)  
埼玉医科大学・医学部・講師  
研究者番号：50322425

### (2) 研究分担者

佐藤 毅 (SATO TSUYOSHI)  
埼玉医科大学・医学部・講師  
研究者番号：60406494

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：