

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 21 日現在

機関番号：22701
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791997
 研究課題名（和文）ペーチェット病の原因解明

研究課題名（英文）Research for the molecular mechanism of Behçet's disease

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

ペーチェット病原因解明のための新規 HLA-B51 トランスジェニックマウスの作製に関する進捗および成果について：

ペーチェット病の原因についてはいまだよくわかっていない。しかし、人種を越えて、ヒトの主要組織適合抗原である HLA (human leukocyte antigen) の特定のタイプ、HLA-B51 と顕著に相関していることが知られている。しかし HLA-B51 がどのように疾患に関わっているのかそのメカニズムは謎のままである。そこで今回、新規に HLA-B51 トランスジェニックマウスの作製をおこなった。

研究成果の概要（英文）：

The progress and achievements of research on the new HLA-B51 transgenic mouse model of Behçet's disease:

The exact cause of Behçet's disease is still unclear. However, it is well known that there is high incidence of HLA-B51 in patients with Behçet's disease. In this study, we generated new transgenic mice to elucidate the function of HLA-B51 in Behçet's disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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：眼免疫学

1. 研究開始当初の背景

ペーチェット病は全身の諸臓器、特に口腔・眼・皮膚・外陰部に急性の炎症を繰り返す難治性炎症疾患である。治療にはコルヒチン、ステロイド、免疫抑制剤等が使われてきた。近年になり炎症性サイトカインである TNFα に対する抗体医薬が開発され、ペーチェット病に使われ始めている。抗 TNFα 抗体は、他の治療薬で効果不十分であった難治性ペーチェット病患者に対しても、その 9 割に有効であるという結果が出ており、劇的に患者

QOL を向上させることがわかった。しかしながら、投薬の中断により眼発作の再燃が多発すること、B 型肝炎や非定型抗酸菌症といった感染症を合併しているときには使用できないこと、抗 TNFα 抗体の効果が弱い症例が存在することなどから、新たな機序による治療法が必要とされている。

ペーチェット病は、人種を越えて、ヒトの主要組織適合抗原 (MHC: major histocompatibility complex) である HLA (human leukocyte antigen) の特定のタイプ、HLA-B51 と顕著に相関していることが知

られている。日本における HLA-B51 の陽性頻度は、健常者群 13.8% に対しベーチェット病患者群で 58.9% と有意に高いということが報告されている (Mizuki *et al.* Tissue Antigens. 2001;58(3):181-4.)。しかし、HLA-B51 がどのように疾患に関わっているのかそのメカニズムは未だ謎のままである。

最近我々は、ベーチェット病患者検体を集め、ゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study) を行い、炎症性サイトカインおよびレセプターである IL-10、IL-12R、および IL-23R の遺伝的多型が、ベーチェット病発症に関与するということが報告された (Mizuki *et al.* Nature Genet. 2010;42(8):703-6.)。また、海外他施設における、日本人以外の他民族検体を用いた研究でも、我々が同定したものと同様の炎症性サイトカインおよびレセプターにおいて、その遺伝的多型が疾患に関与しているということが示された (Remmers *et al.* Nature Genet. 2010;42(8):698-702.)。以上より、HLA-B51 と上記の炎症性サイトカインが、何らかの作用機序で、複合的にベーチェット病発症に関与している可能性が非常に高いと考えられる。

2. 研究の目的

HLA-B51 を含む、HLA クラス I 分子をマウス体内において過剰発現させるトランスジェニックマウスに関しては、今まで多くの施設で作製され解析されてきた。しかし、HLA 発現に成功しても、効率的に抗原提示をできないことも多いということが報告されている (Pascolo *et al.* Expert Opin Biol Ther. 2005;5(7):919-38. Review.)。HLA-B51 過剰発現トランスジェニックマウスはすでに 1990 年代に解析されている (Takeno *et al.* Arthritis Rheum. 1995;38(3):426-33.)。HLA-B51 トランスジェニックマウスでは好中球の機能異常を示した。しかし他の大きなフェノタイプは認められておらず、HLA-B51 がベーチェット病の病因になっているかどうかはいまだ動物実験レベルで示されていない。この HLA class I 過剰発現マウスは、第 1 世代の HLA class I トランスジェニックマウスと言われている。ヒトのクラス I HLA をそのままマウスの体内で強制発現させたもので、細胞傷害性 T 細胞への抗原提示能がそれほど強くないと考えられている。その後考案された、第 2 世代トランスジェニックマウスでは、MHC クラス I 分子の a1 および a2 ドメインをヒト由来で a3 ドメインをマウス由来にした。あるいは a1~a3 ドメインはすべてヒト由来であるが、b2

microglobulin をマウス由来、および CD8 をヒト由来としたものであった。さらに第 3 世代 HLA class I トランスジェニックマウスでは、MHC クラス I 分子の a1 および a2 ドメインをヒト由来 a3 ドメインをマウス由来にし、b2 microglobulin をヒト由来とし、さらにマウス MHC クラス I である、H2-D と H2-K を欠損させたものとなっている。この結果導入ベクターの高い安定性と、マウス T 細胞への効率的な抗原提示が可能となった。

そこで、本研究課題では、最新の手法を用いて HLA-B51 に関して、新たに機能発現が高いと考えられる第 3 世代トランスジェニックマウスを作製し解析することにより、HLA-B51 とベーチェット病の関係を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

トランスジーンは抗原提示能が高いと言われている第 3 世代の方法で構築した。具体的には、a1 および a2 ドメインがヒト由来、a3 ドメインから細胞貫通領域および細胞内領域はマウス由来のキメラ分子を作った。a1 ドメインの先にリンカーでヒト b2 microglobulin を結合させ、monochain としたものを作製した。定法に従い、C57BL/6 由来の受精卵雄性前核へ作製したベクター DNA を注入し、その後仮親卵管に移植するといった方法で、トランスジェニックマウスを作製した。

4. 研究成果

3 系統のトランスジーン陽性ファウンダーマウスを PCR 法にて確認することができた。ファウンダーマウスを C57BL/6 野生型マウスと交配し、F1 世代マウスを全 3 系統で得ることができた。F1 世代マウスにおいてもトランスジーンが受け継がれることを PCR 法にて確認できた。それら 3 系統の F1 世代マウス脾臓細胞を使って、細胞表面における HLA-B51 の発現を、フローサイトメトリーを用いて確認した。その結果、2 系統において強い発現を、1 系統において弱い発現を認めた。現在、マウス MHC クラス I 分子の影響を除外するために、これらトランスジェニックマウスにおいて、マウス MHC クラス I 分子を欠損させている段階である。

今後、以前報告されているような FMLP による好中球の活性化や、発現の増強など確認していく予定である。このマウスを用い、HLA-B51 特異的ペプチドの探索や、特異的阻

害薬の探索に用いることができると考えられる。また、ベーチェット病様炎症の誘導も試みていき、ベーチェット病の病態解明に貢献できると考えられる。

既述のように、我々および海外のグループは IL-10、IL-12R、IL-23R といった炎症性サイトカインおよび受容体遺伝子の塩基多型が、ベーチェット病の発症と関連しているということを発表した。これら炎症性サイトカインが、作製した HLA トランスジェニックマウス体内においてどのような動態をし、どのような役割を果たしているかを明らかにする。HLA と炎症性サイトカインの関係性については、未だよく分かっておらず、その対応を明らかにすることは非常に興味深いことである。また、ベーチェット病疾患感受性炎症性サイトカインの遺伝子改変マウスを他施設から入手し、作製した HLA トランスジェニックマウスとかけあわせ、それらが相乗的に病気の発症に関与しているかどうかを検討し明らかにしていく。

最近になり、米国国立衛生研究所とイスタンブール大学との共同研究で、ベーチェット病患者 2,650 人を含む日本人・トルコ人約 5 千人のゲノムワイド関連解析が実施された。その結果、CCR1、STAT4、KLRC4、ERAP1 の 4 つのベーチェット病関連遺伝子が同定された (Kirino *et al.* *Nat Genet.* 2013;45(2):202-7.)。ERAP1 のリスクアレルと HLA-B51 両者の素因を持つと、発症リスクが相乗的に上昇することが分かった。小胞体アミノペプチダーゼである ERAP1 は小胞体に存在し、内在性抗原ペプチドのプロセッシングにかかわっている。ERAP1 の変異により、ペプチドのトリミングが変化し、HLA-B51 が提示するペプチドに変化が起き、自己認識を失ってしまう免疫反応が起こることが予想される。今後本研究で作製している HLA-B51 トランスジェニックマウスの他に、ERAP1 の塩基変異マウスやノックアウトマウスを作製し、HLA-B51 と ERAP1 のエピスタシスの意味するところを解明していく必要がある。

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 9 件)

- ① Kirino Y, Bertsiyas 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):202-7. (査読あり)

- ② Miura H, Inoko H, Inoue I, Okada Y, Tanaka M, Sato M, Ohtsuka M. piggyBac-mediated generation of stable transfectants with surface human leukocyte antigen expression from a small number of cells. *Anal Biochem.* 2013;437(1):29-31. (査読あり)
- ③ Takeuchi M, Asukata Y, Kawagoe T, Ito N, Nishide T, Mizuki N. Infliximab monotherapy versus infliximab and colchicine combination therapy in patients with Behçet's disease. *Ocul Immunol Inflamm.* 2012;20(3):193-7. (査読あり)
- ④ Ohtsuka M, Miura H, Sato M, Kimura M, Inoko H, Gurumurthy CB. PITT: pronuclear injection-based targeted transgenesis, a reliable transgene expression method in mice. *Exp Anim.* 2012;61(5):489-502. (査読あり)
- ⑤ Sato M, Akasaka E, Saitoh I, Ohtsuka M, Watanabe S. Development of a technique for efficient gene transfer to antral follicular cells in the mouse ovary. *Syst Biol Reprod Med.* 2012;58(3):136-41. (査読あり)
- ⑥ Ohtsuka M, Miura H, Nakaoka H, Kimura M, Sato M, Inoko H. Targeted transgenesis through pronuclear injection of improved vectors into in vitro fertilized eggs. *Transgenic Res.* 2012;21(1):225-6. (査読あり)
- ⑦ 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 (Oxford).* 2012;51(6):983-6. (査読あり)
- ⑧ Nishida T, Shibuya E, Asukata Y, Nakamura S, Ishihara M, Hayashi K, Takeno M, Ishigatsubo Y, Mizuki N.

Clinical Course before and after
Cataract and Glaucoma Surgery under
Systemic Infliximab Therapy in
Patients with Behçet's Disease. Case
Rep Ophthalmol. 2011;2(2):189-92.
(査読あり)

- ⑨ 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.
2011;72(3):269-72. (査読あり)

[学会発表] (計1件)

- ① 河越龍方 ベーチェット病疾患関連遺伝
子HLA-B51の機能解析 日本眼科学会 2013
年4月4日 東京国際フォーラム(東京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

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

大塚 正人 (OHTSUKA MASATO)
東海大学・医学部・講師
研究者番号：90372945