

ベーチェット病における免疫遺伝学的発症機構

水木 信久*, 大野 重昭*, 鎌田 光二*, 中村 聡*, 石原 麻美*
佐藤 薫**, 稲葉 午朗***, 辻 公美**, 猪子 英俊**

*横浜市立大学医学部眼科学教室, **東海大学医学部第2移植学教室

***七沢リハビリテーション病院脳血管センター内科

要 約

ベーチェット病の発症機構を免疫遺伝学的に解明するため, 66例の本病患者を対象としてHLAの検索を行った。対照として健康成人99例も同様にHLAタイピングを行った。HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ抗原はリンパ球細胞傷害試験により検索し, HLA-DP抗原はPCR-RFLP法により検索した。その結果HLA-B51は本病患者で著明な増加を示したが, B51とアミノ酸配列が2カ所しか異なっていないBw52には有意な変化は認められなかった。また, A11, Aw33, B35, B44, DQw1は有意に低下していた。HLA-DP抗原には有意差は認められなかった。以上よりベーチェット病には遺伝的な疾患感受性因子と疾患抵抗性因子が存在し, これらの遺伝的要因はクラスI抗原, 特にHLA-B遺伝子近傍にマップされることが推測される。また, クラスIIのHLA-DQ遺伝子近傍に第2の疾患抵抗性遺伝子の存在も示唆された。(日眼会誌 95:783-789, 1991)

キーワード: ベーチェット病, HLA抗原, HLA-DP抗原, 疾患感受性因子, 疾患抵抗性因子

Immunogenetic Mechanism of Behçet's Disease

Nobuhisa Mizuki*, Shigeaki Ohno*, Koji Kamata*,
Satoshi Nakamura*, Mami Ishihara*, Kaoru Sato**,
Goro Inaba***, Kimiyoshi Tsuji** and Hidetoshi Inoko**

*Department of Ophthalmology, Yokohama City University School of Medicine

**The Second Department of Transplantation, Tokai University School of Medicine

***Department of Internal Medicine, The Nanasawa Rehabilitation Hospital Comprehensive Stroke Center

Abstract

In order to investigate the immunogenetic mechanism of Behçet's disease, frequencies of HLA antigens were studied in patients. The subjects consisted of 66 patients and 99 normal controls. A lymphocyte cytotoxicity test was used for typing HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ antigens. HLA-DP antigens were analyzed by the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method. A significant increase of HLA-B51 was observed in the patients. In contrast, no significant difference was observed in HLA-Bw52 which possesses only two different amino acids from HLA-B51. On the contrary, frequencies of HLA-A11, HLA-Aw33, HLA-B35, HLA-B44 and HLA-DQw1 were significantly lower in the patients than in the controls. No significant difference was observed in HLA-DP antigens. These results suggest that Behçet's disease involves both disease

別刷請求先: 232 横浜市南区浦舟町3-46 横浜市立大学医学部眼科学教室 水木 信久
(平成3年1月11日受付, 平成3年3月19日改訂受理)

Reprint requests to: Nobuhisa Mizuki, M.D. Department of Ophthalmology, Yokohama City University School of Medicine.

3-46 Urafune-cho, Minami-ku, Yokohama 232, Japan

(Received January 11, 1991 and accepted in revised form March 19, 1991)

susceptibility factors and disease resistance factors and that such genetic factors are mapped within or very close to the HLA-B gene in the class I gene region. Additionally class II HLA-DQ antigen is associated with disease resistance factors. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 95: 783-789, 1991)

Key words: Behçet's disease, HLA antigen, HLA-DP antigen, Disease susceptibility genes, Disease resistance genes

I 緒 言

ヒトの主要組織適合複合体 (major histocompatibility complex; MHC) である HLA 抗原は、外来抗原が侵入した場合に免疫担当細胞間の相互作用に遺伝的拘束因子として機能し、免疫応答や疾患感受性など生体防御に深くかかわっている¹⁾。ベーチェット病では、大野らが1973年に HLA-B5との相関を報告²⁾して以来、特定の遺伝的背景のもとに何らかの外的環境要因が作用し、これらの相互作用によって発症に至ると考えられている³⁾⁻⁹⁾。特に B5の分離抗原のひとつである HLA-B51は本病の発症因子として重要視されている。また、本病における疾患抵抗性因子の存在についても近年論じられてきている⁴⁾¹⁰⁾。

今回われわれは、ベーチェット病の免疫遺伝学的発症機序をさらに解明するために HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ, -DP 抗原の検索を行った。

II 対象および方法

1. 対象

横浜市立大学医学部附属病院眼科ぶどう膜炎外来においてベーチェット病と診断された58例の本病患者と七沢リハビリテーション病院脳血管センター内科においてベーチェット病と診断された8例の本病患者である。患者の内訳は、男34例、女32例であり、病型別では完全型29例、不全型37例である。症状別にみると眼症状57例、皮膚症状55例、口内炎64例、陰部潰瘍38例が認められたが神経ベーチェット病患者は1例も認め

(症例1)

(症例2)

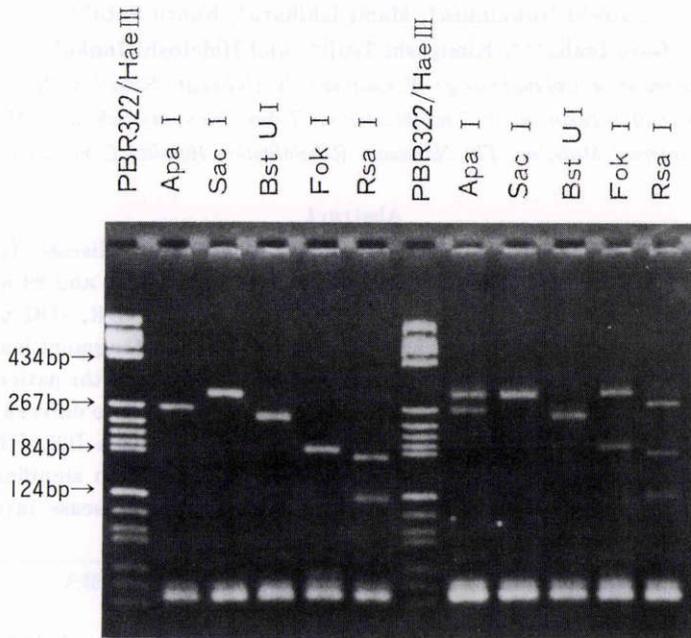


図1 PCR法にてDPB1遺伝子を増幅後、各タイプを特異的に認識する5種類の制限酵素で切断した時のRFLPパターン。このパターンを検索し、症例1はDPB1*0201のホモ、症例2はDPB1*0301とDPB1*0201のヘテロであることがわかる。

なかった。これらと比較するため健康成人99例において同様に HLA 抗原を検索し、これを正常対照とした。患者、健康成人とも HLA-DNA タイピング検索同意のもとで採血を行った。

2. 方法

HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ 抗原は NIH 標準法による補体依存性リンパ球細胞傷害試験によって検索した。HLA-DP 抗原は従来二次混合リンパ球培養 (primed lymphocyte typing; PLT)¹¹⁾により決定されていたが、操作が煩雑なことから、今回は HLA-DNA タイピング¹²⁾により検索した。すなわち polymerase chain reaction (PCR) 法にて増幅後、restriction fragment length polymorphism (RFLP) 法にてタイピングを行った。DP 抗原で多様性が知られているのは、DPB1 遺伝子の $\beta 1$ ドメイン (エキソン 2) であるためこの領域を特異的に増幅するプライマーである

DPB101 と DPB201 を用いて DP 抗原の PCR-RFLP 法¹³⁾を施行した。95°C で変性、62°C でアニーリング、72°C で伸長反応を行うことによって 2 倍に増幅する。このサイクルを 30 回繰り返すことによって 2³⁰、約百万倍に増幅することができる。続いて各タイプを特異的に認識する制限酵素 (ApaI, SacI, BstUI, FokI, RsaI) で切断し電気泳動することにより、その RFLP パターンを検索し DP 抗原タイプを決定した。図 1 にその 1 例を示した。

HLA とベーチェット病との相関を見いだすために、相対危険率及び χ^2 乗検定法を算出し P 値を求めた。観察値が 5 未満の数を含む場合は、Fisher の直接法により P 値を算定した。

III 結 果

1. HLA-A 抗原頻度

ベーチェット病患者の HLA-A 抗原頻度は表 1 にし

表 1 ベーチェット病における HLA クラス I 抗原頻度

Antigen	Control (N=98)	Patient (N=66)	χ^2	P	Relative Risk
A 2	38 (38.8%)	32 (48.5%)	7.57	<0.01	0.3
A 11	30 (30.6%)	8 (12.1%)			
A 24	51 (52.0%)	36 (54.5%)			
A 26	21 (21.4%)	21 (31.8%)			
A 31	15 (15.3%)	16 (24.2%)			
Aw 33	13 (13.3%)	1 (1.5%)	6.97	0.0059	0.1
B 7	11 (11.2%)	3 (4.5%)	5.14	0.0181	0.3
B 13	1 (1.0%)	2 (3.0%)			
B 27	0 (0.0%)	2 (3.0%)			
B 35	18 (18.4%)	4 (6.1%)			
B 39	8 (8.2%)	6 (9.1%)			
B 44	9 (9.2%)	1 (1.5%)			
Bw 46	10 (10.2%)	7 (10.6%)			
Bw 48	8 (8.2%)	2 (3.0%)			
B 51	16 (16.3%)	38 (57.6%)			
Bw 52	15 (15.3%)	7 (10.6%)			
Bw 54	18 (18.4%)	8 (12.1%)	30.39	<0.00005	6.4
Bw 55	7 (7.1%)	1 (1.5%)			
Bw 56	0 (0.0%)	2 (3.0%)			
Bw 60	13 (13.3%)	6 (9.1%)			
Bw 61	25 (25.5%)	15 (22.7%)			
Bw 62	10 (10.2%)	11 (15.2%)			
Bw 67	3 (3.1%)	1 (1.5%)			
Cw 1	28 (28.6%)	18 (27.3%)			
Cw 3	44 (44.5%)	23 (34.8%)			
Cw 4	4 (4.1%)	6 (9.1%)			
Cw 7	23 (23.5%)	13 (19.7%)			

表2 ベーチェット病における HLA-DR, -DQ 抗原頻度

Antigen	Control (N=99)	Patient (N=66)	χ^2	P	Relative Risk
DR 1	8 (8.2%)	4 (6.1%)	10.28	<0.0005	0.4
DR 2	30 (30.3%)	19 (28.8%)			
DR 4	47 (47.5%)	27 (40.9%)			
DR 5	19 (19.2%)	10 (15.2%)			
DRw 6	19 (19.2%)	10 (15.2%)			
DRw 8	14 (14.1%)	12 (18.2%)			
DRw 9	27 (27.3%)	26 (39.4%)			
DRw 52	55 (55.6%)	33 (50.0%)			
DRw 53	69 (69.7%)	47 (71.2%)			
DQw 1	71 (71.7%)	31 (47.0%)			
DQw 3	71 (71.7%)	48 (72.7%)			
DQw 4	23 (23.2%)	21 (31.8%)			

表3 ベーチェット病における HLA-DPB1 対立遺伝子頻度

HLA	Control (N=82)	Patient (N=51)	χ^2	P	Relative Risk
DPB1 * 0101	2 (2.4%)	2 (3.9%)			
DPB1 * 0202	8 (9.8%)	1 (2.0%)			
DPB1 * 0301	12 (14.6%)	8 (15.7%)			
DPB1 * 0401	5 (6.1%)	1 (2.0%)			
DPB1 * 0402 (0201)	45 (54.9%)	28 (54.9%)			
DPB1 * 0501	47 (57.3%)	35 (68.6%)			
DPB1 * 0601	0 (0.0%)	1 (2.0%)			
DPB1 * 0901	11 (13.4%)	4 (7.8%)			
DPB1 * 1401	0 (0.0%)	1 (2.0%)			
DPB1 * 1601	3 (3.7%)	1 (2.0%)			
DPB1 * 2001	0 (0.0%)	1 (2.0%)			

めす様に、正常対照に比し A11, Aw33で有意の低下を認められた (A11; $p < 0.01$, R.R.=0.3, Aw33; $p = 0.0059$, R.R.=0.1).

2. HLA-B 抗原頻度

本病患者では HLA-B51頻度が著明に増加 ($p < 0.00005$, R.R.=6.4)していたが、Bw52には有意差を認めなかった。また、HLA-B35, B44はいずれも有意に低下していた (B35; $p = 0.0181$, R.R.=0.3, B44; $p = 0.0402$, R.R.=0.2)。

3. HLA-C 抗原頻度

HLA-C 抗原では患者と対照群の間で有意差を認められるものはなかった。

4. HLA-DR, -DQ 抗原頻度

表2にしめす様に、本病患者では DQw1の有意の低

下を認めた ($p < 0.0005$, R.R.=0.4)。これ以外には患者群と対照群の間で有意差を示す DR, DQ 抗原は認められなかった。

5. HLA-DP 抗原頻度

表3にみる様に、HLA-DP 抗原では両群間で有意差を示すものはなかった。

IV 考 按

ベーチェット病の発症機構には、疾患感受性因子と疾患抵抗性因子の2つの遺伝的要因が関与していると言われている⁹⁾¹⁰⁾。今回の研究において本病患者の HLA-B51は従来の報告どおり著明に増加しており、疾患感受性因子であると推測される。しかしながら、HLA-B51自身が疾患感受性遺伝子であるのか、それと

いても HLA-B 近傍にあると推測され、B44は疾患抵抗性因子である可能性が考えられる。

そこで、HLA-B 抗原自身がベーチェット病の発症に関係する可能性について考察する。すなわち B51が疾患感受性遺伝子であり、B44が疾患抵抗性遺伝子であるという仮説である。これまで HLA-Bw52について論じられた報告はほとんどないが、Bw52は B51と同様に B5グループに含まれ、いずれも B5のスプリット抗原である。近年両者の塩基配列（アミノ酸配列）が決定され¹⁶⁾¹⁷⁾、Bw52と B51では2カ所のアミノ酸しか異なっていないことが明らかにされた。すなわち図3で示す様に B51は α 1ドメインの63番目のアミノ酸がアスパラギンで67番目のアミノ酸がフェニルアラニンであるのに対し Bw52では、63番目がグルタミン酸で67番目がセリンである。この2カ所のみアミノ酸の相違にもかかわらずベーチェット病における B51と Bw52の抗原頻度は著しく異なっている。また、疾患抵抗性因子の1つと考えられる B44では63番目がグルタミン酸で67番目がセリンであり Bw52のそれと一致していたことも興味深い。近年 HLA の高次立体構造が明らかにされ¹⁸⁾、HLA 抗原分子におけるペプチド結合部位¹⁹⁾も明らかにされてきた。いわゆるホットドッグモデルであるが、それによればこの α 1ドメインの63番目と67番目のアミノ酸は α ヘリックス上の溝（クレバス）に位置し、ペプチドをはさみこむ場所の一部であることが知られており、T細胞への抗原提示に際して機能的に重要な部位である。もし、HLA-B 抗原自身が疾患と関係すると仮定した場合、若年性糖尿病と DQ β 鎖57-非 Asp²⁰⁾、慢性関節リウマチと DR β 鎖70~74の塩基性アミノ酸²¹⁾、天疱瘡と DQ β 鎖57-Asp²²⁾等のモデルと同様に、HLA-B 抗原の63番目と67番目のアミノ酸が疾患の発症に関係すると推測される。しかしながら、T細胞の抗原認識には、T細胞レセプター、HLA クラス I またはクラス II、短く断片化された外来抗原の間で相互作用を及ぼしあい3分子複合体が形成されることが必要である²³⁾ため、発症要因となる外来抗原（自己抗原？）もはっきりと確定していないベーチェット病においては、抗原の同定など今後のさらなる解析を待たねばならない。

次にクラス II 抗原については、従来疾患抵抗性因子として考えられていた DR1、DQw1⁴⁾¹⁰⁾は本研究では DQw1では有意に低下していたが、DR1では有意差は認められなかった。DR1はそのすべてが DQw5 (DQw1) と連鎖不平衡の関係にあるが、一方 DQw1は

DR1、DR2、DRw6、DRw10、DR Bon との連鎖不平衡が知られている¹¹⁾²⁾。したがって従来報告での DR1の低値は単に DQw1との連鎖不平衡の結果であり、真の疾患抵抗性因子は DQw1である可能性が高い。最近、HLA-DQ 抗原は免疫制御に関与すると言われており、DQ 抗原が抗原特異的または非特異的なサブレッサー T 細胞の活性化に関与していると考えられている²⁴⁾。また血清学的に DQw1 を規定する遺伝子と考えられている DQA1、DQB1対立遺伝子は DQA1 * 0101~0103、DQB1 * 0501~0503、DQB1 * 0601~0604が知られているため、今後 PCR 法にて DQ 抗原の DNA タイピングを行う必要がある。

最後に、今回われわれはベーチェット病では初めてクラス II HLA-DP 抗原の検索を行った。図2の DQB1と DQB3、AとFの間に各々組み換えのホットスポットの存在が示唆されており、DP 抗原はそのセントロメア側末端に位置するため、予想どおり DP 抗原はベーチェット病の発症には有意な相関を示さなかった。この事実はベーチェット病に関与する遺伝子はテロメア側、すなわち HLA-B 抗原遺伝子および HLA-DQ 抗原遺伝子近傍に存在するという考えを支持している。表中の DPB1 * 2001は今回われわれが DPB1遺伝子タイピングでみいだした新しいタイプであるため命名したもので、現在シーケンシングにより塩基配列を決定中である。

今後、前述した様な観点からさらにベーチェット病患者の HLA-DNA タイピングを進めていく必要があると同時に、*Streptococcus sanguis* をはじめとする外来抗原の検索をも進めていく必要がある。

尚、本研究の一部には厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班、及び横浜市特定研究（難病）研究班の補助を受けた。

文 献

- 1) 水木信久, 猪子英俊, 辻 公美: 最近の HLA の分子の基礎とその臨床応用. 医学のあゆみ 157: 347-351, 1991.
- 2) Ohno S, Aoki K, Sugiura S, et al: HLA-B5 and Behçet's disease. Lancet 2: 1383-1384, 1973.
- 3) 中山承代: ベーチェット病と HLA 抗原. 北海道医誌 60: 644-652, 1985.
- 4) 大野重昭, 広瀬茂人, 吉田 篤, 他: ベーチェット病における疾患感受性因子及び疾患抵抗性因子の検索. 日眼会誌 90: 767-770, 1986.
- 5) 増田寛次郎, 沼賀二郎, 林 清文, 他: 難治性ベーチェット病の HLA クラス I, II について. 厚生省

- 特定疾患ベーチェット病調査研究班, 昭和61年度研究業績, 39—42, 1987.
- 6) 大野重昭, 磯貝恵美子, 磯貝 浩, 他: ベーチェット病患者由来 *Streptococcus Sanguis* の血小板活性化作用. 厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班, 昭和63年度研究業績, 30—33, 1988.
 - 7) 宮田昌之, 大原守弘, 森藤隆夫, 他: 組織破壊に伴ってウサギに出現する抗レンサ球菌抗体. 厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班, 昭和63年度研究業績, 44—46, 1988.
 - 8) 宮永嘉隆, 氏原 弘, 高野真綾, 他: *Streptococcus Sanguis* による動物実験モデル作製の研究. 厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班, 平成元年度研究業績, 61—62, 1989.
 - 9) 大原守弘, 宮田昌之, 木田さとみ, 他: 組織抗原と連鎖球菌抗原の交叉性についての検討—第2報—, 厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班, 平成元年度研究業績, 93—95, 1989.
 - 10) 大野重昭, 市石 昭, 栗田佳子, 他: ベーチェット病患者家族における HLA の研究. 日眼会誌 93: 215—217, 1989.
 - 11) 能勢義介: HLA 検査法. 日本臨床 43(増刊): 367—373, 1985.
 - 12) 猪子英俊: MHC と免疫—MHC DNA タイピング. Annual Review 1990: 251—272, 1990.
 - 13) Maeda M, Uryu N, Inoko H, et al: A simple and rapid method for HLA-DP genotyping digestion of PCR-amplified DNA with allele-specific restriction endonucleases. Hum Immunol 27: 111—121, 1990.
 - 14) 猪子英俊: 免疫系と MHC—MHC 抗原とその遺伝子. Annual Review 免疫 1988: 115—123, 1988.
 - 15) 十字猛夫: 第8回 HLA ワークショップ共同報告 (III). 移植 18: 150—203, 1983.
 - 16) Hayashi H, Ennis PD, Ariga H, et al: HLA-B51 and HLA-Bw52 differ by only two amino acids which are in the helical region of the $\alpha 1$ domain. J Immunol 142: 306—311, 1989.
 - 17) Muller AC, Engler-Blum G, Fekeler V, et al: Genetic and serological heterogeneity of the supertypic HLA-B locus specificities Bw4 and Bw6. Immunogenetics 30: 200—207, 1989.
 - 18) Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, et al: Structure of human class I histocompatibility antigen, HLA-2. Nature 329: 506—512, 1987.
 - 19) Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, et al: The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. Nature 329: 512—518, 1987.
 - 20) Todd JA, Bell JI, McDevitt HO: HLA-DQ β gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. Nature 329: 599—604, 1987.
 - 21) Todd JA, Acha-Orbea H, Bell JI, et al: A molecular basis for MHC class II associated autoimmunity. Science 240: 1003—1009, 1988.
 - 22) Scharf SJ, Friedmann A, Brautbar C, et al: HLA class II allelic variation and susceptibility to pemphigus vulgaris. Proc Natl Acad Sci USA 85: 3504—3508, 1988.
 - 23) Rothbard JB: Major histocompatibility complex-peptide interactions. Current Opinion in Immunology 2: 99—105, 1989.
 - 24) 猪子英俊: HLA-DQ による免疫制御. 臨床免疫 21: 945—957, 1989.