

第96回 日本眼科学会総会 宿題報告

免疫と眼

眼疾患の免疫遺伝学的研究

大野 重昭

横浜市立大学医学部眼科学教室

共同研究者

水木 信久, 新藤裕美子, 西尾 昌代, 内尾 英一, 中村 聡
石岡みさき, 矢吹 淳, 磯部 裕, 秦野 寛, 鎌田 光二
山本 倬司, 猪子 英俊, 辻 公美, 石井 則久, 奥田 研彌

要 約

近年急速な進歩をとげた分子生物学的, 分子遺伝学的手法を用い, ペーチェット病の免疫遺伝学的発症機構を DNA レベルで検索したところ, 第一義的な相関は HLA クラス I の HLA-B 51 であった. つぎに TNF- β (tumor necrosis factor- β) 遺伝子の多型性を調べたところ, 95%のペーチェット病患者は 10.5 kbp の Nco I 断片を有していた. 従って, ペーチェット病の疾患感受性遺伝子は第 6 染色体短腕上の HLA-B 座と TNF- β 座の間にあり, しかも TNF- β 座のごく近傍に位置することが明らかとなった. 一方, 日本人に多発する原田病について同様に HLA-DNA タイピングを行ってみると, 患者群では HLA-DRB 1 * 0405, HLA-DQA 1 * 0301, そして HLA-DQB 1 * 0401 が有意に増加していた. これら HLA 遺伝子のアミノ酸配列の検索結果から, HLA-DR 抗原の 57 番目にセリンを, また DQ 抗原の 70 番目にグルタミン酸, 71 番目にアスパラギン酸を有する個体は, 断片化された外来抗原ペプチドとの結合が容易におこり, 外来抗原情報が提示されて T 細胞の活性化を誘導し, ついには原田病発症にいたるものと考えられる. また, 臨床的に原田病の近縁疾患である交感性眼炎でも原田病と同一 HLA 相関の成績が得られた. 眼疾患の背景に存在する免疫遺伝学的発症機構の研究結果は, 従来不明であった眼疾患の遺伝的感受性, 個体差, 人種差などの理解に新たな光りを投げかけただけでなく, 眼疾患の診断, HLA 型別臨床像の再分類, 予後判定に多大の貢献をした. 今後, 遺伝子工学の急速な進歩により, 眼疾患の遺伝子治療にむけて一層の研究進歩が期待される. (日眼会誌 96: 1558-1579, 1992)

キーワード: ぶどう膜炎, 免疫遺伝学, 分子生物学, HLA, アミノ酸配列

別刷請求先: 236 横浜市金沢区福浦 3-9 横浜市立大学医学部眼科学教室 大野 重昭
(平成 4 年 8 月 19 日受付, 受理)

Reprint requests to: Shigeaki Ohno, M.D. Department of Ophthalmology, Yokohama City University School of Medicine. 3-9 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama 236, Japan
(Received and accepted August 19, 1992)

Immunogenetic and Molecular Genetic Studies on Ocular Diseases

Shigeaki Ohno

Department of Ophthalmology, Yokohama City University School of Medicine

Abstract

The immunogenetic mechanisms of various ocular diseases were investigated utilizing recently developed molecular biological and molecular genetic techniques. It was revealed that HLA-B 51 was closely associated with Behçet's disease. Investigation of genetic polymorphism of TNF- β (tumor necrosis factor- β) showed that 95% of Behçet's disease patients had the 10.5 kbp Nco I fragment. It was therefore concluded that the gene of susceptibility to Behçet's disease is located between HLA-B and TNF- β loci on the short arm of chromosome 6. Similar studies of HLA-DNA typing in Harada's disease frequently seen in Japan showed that frequencies of HLA-DRB1 * 0405, HLA-DQA1 * 0301 and HLA-DQB1 * 0401 were significantly increased in patients compared with normal controls. These data suggested that those who have serine at position 57 of HLA-DR, glutamic acid at position 70 and aspartic acid at position 71 of HLA-DQ respond to certain unknown agents significantly more than those without them, thus leading to the development of Harada's disease. The same HLA association was observed between Harada's disease and sympathetic ophthalmia, and the immunogenetic mechanism was thought to be similar in both diseases. Recent immunogenetic and molecular genetic investigations on various ocular diseases have shed new light not only on the genetic individual susceptibility and biased racial differences, but also on the diagnosis of the ocular diseases, reclassification of disease entities according to HLA associations, and judgement of disease prognosis. Further progress of molecular medicine may make it possible to treat various intractable ocular diseases by gene therapy in the near future. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 96: 1558—1579, 1992)

Key words: Uveitis, Immunogenetics, Molecular genetics, HLA, Amino acid sequences

I 緒 言

マウスの兄妹間移植実験において、ドナーとレシピエント間で型を一致させると、その移植成績を著明に改善させる一連の抗原系(H-2 抗原系)が発見され、その種にとって最も強い移植抗原系は主要組織適合抗原と名付けられた。その後、Snell¹⁾や Benacerraf ら²⁾³⁾によってそれらをコードする複数の遺伝子座が発見され、主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex; MHC) と命名された。ヒトの MHC は第 6 染色体上にある HLA (human leukocyte-associated antigen) 遺伝子で、マウスでは第 17 染色体上の H-2 遺伝子、ラットでは第 20 染色体上の RT-1 遺伝子である(図 1)。HLA 抗原は HLA 遺伝子によりコードされる細胞膜蛋白であり、高度の遺伝的多型性を有し、自己と非自己の識別を通じて免疫応答を支配している。すなわち、HLA 抗原は自己の標識としての役割を果たしており、細菌やウイルスなどの外来抗原が体内に侵入した際に、それらを自己の

- HLA : ヒト白血球抗原(遺伝子) ⇨ HLA 抗原
(human leukocyte-associated antigen)
～第6染色体短腕～
- H-2 : マウス主要組織適合抗原(遺伝子) ⇨ H-2抗原
(histocompatibility-2)
～第17染色体～
- RT-1 : ラット主要組織適合抗原(遺伝子) ⇨ RT-1抗原
(major histocompatibility complex of rat)
～第20染色体～

図 1 主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex)。

HLA 抗原と照合し、非自己(敵)と認識し排除させるように T 細胞にその情報を伝達する。このように HLA 抗原は、外敵に対する生体防御という重要な機能を担っているといえる。

本稿では HLA 抗原の構造と機能を中心に、HLA と相関することが知られているベーチェット病、原田病および交感性眼炎の免疫遺伝学的、分子生物学的発症

機序について、われわれの最近の成績をもとに述べてみたい^{4)~6)}。

II HLA 抗原と HLA 遺伝子

1. HLA 抗原の分類、構造、発現

HLA 抗原はその構造、機能、発現細胞などの点からクラス I 抗原とクラス II 抗原の 2 つに分類される。クラス I 抗原遺伝子とクラス II 抗原遺伝子間に補体など (C2, C4, Bf) をコードする遺伝子群が存在し、便宜上クラス III 抗原と呼ばれているが、HLA 抗原とは機能的に関係のない遺伝子群である (図 2)。HLA 抗原は自己と非自己の識別という役割にふさわしく高度の遺伝的多型性を有し、数多くのアロ抗原 (タイプ) が知られている (表 1)。

1) HLA クラス I 抗原

HLA クラス I 抗原は、分子量 45,000 の H 鎖 (α 鎖) の糖ペプチドと分子量 12,000 のポリペプチドである

β_2 ミクログロブリン (L 鎖) が非共有結合で会合した細胞膜抗原である (図 3)。H 鎖は α_1 ドメイン、 α_2 ドメイン、 α_3 ドメイン、TM (細胞膜結合領域)、CY (細胞内領域) よりなっている。遺伝的多型性、すなわちアロ抗原決定基は α_1 ドメインと α_2 ドメインに集中している。 α_2 ドメインと β_2 ミクログロブリンは、免疫グロブリンの定常領域に類似した高次構造をとり、クラス II 抗原、T 細胞レセプター、N-CAM (neural-cellular adhesion molecule) などと共に共通の祖先遺伝子から進化した、いわゆる免疫グロブリン超遺伝子族 (immunoglobulin supergene family) に含まれている。また、 β_2 ミクログロブリンは、ゴルジ体で蛋白合成された H 鎖の細胞膜への移送にも重要な役割を担っている⁷⁾。

クラス I 抗原は多型性に富んだ HLA-A, B, C 抗原が従来より知られていたが、最近、遺伝子クローンの解析により新しく HLA-E⁸⁾, F⁹⁾, G¹⁰⁾ 抗原が相ついで

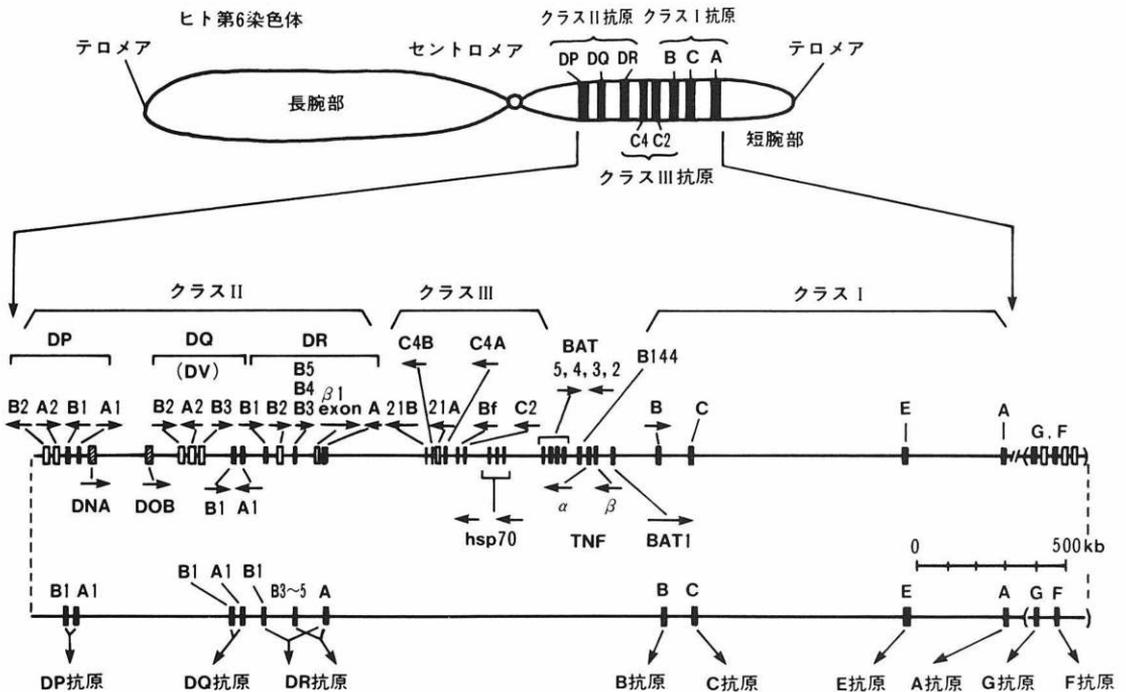


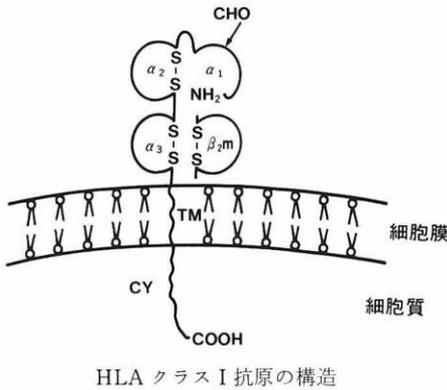
図 2 HLA 遺伝子群の遺伝子構造 [文献 6)より引用]

矢印は遺伝子の方向性を示す, hsp 70 ; 熱ショック蛋白質 70, 21 ; 21 ヒドロキシラーゼ, BAT ; 機能不明の遺伝子 (HLA-B associated transcript), B 144 ; 機能不明の遺伝子, TNF ; 腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor).

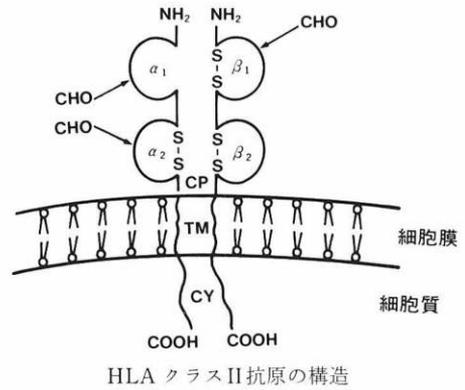
† : 発現されている遺伝子, ‡ : mRNAは合成されているが蛋白質が同定されていない遺伝子, †† : 発現が認められない遺伝子

表 1 HLA 抗原アロ特異性 (1991 年国際組織適合性ワークショップによる)

A	B	C	D	DR	DQ	DP
A 1	B 5	Cw 1	Dw 1	DR 1	DQ 1	DP 1
A 2	B 7	Cw 2	Dw 2	DR 103	DQ 2	DP 2
A 210	B 703	Cw 3	Dw 3	DR 2	DQ 3	DP 3
A 3	B 8	Cw 4	Dw 4	DR 3	DQ 4	DP 4
A 9	B 12	Cw 5	Dw 5	DR 4	DQ 5(1)	DP 5
A 10	B 13	Cw 6	Dw 6	DR 5	DQ 6(1)	DP 6
A 11	B 14	Cw 7	Dw 7	DR 6	DQ 7(3)	
A 19	B 15	Cw 8	Dw 8	DR 7	DQ 8(3)	
A 23(9)	B 16	Cw 9(w 3)	Dw 9	DR 8	DQ 9(3)	
A 24(9)	B 17	Cw 10(w 3)	Dw 10	DR 9		
A 2403	B 18		Dw 11(w 7)	DR 10		
A 25(10)	B 21		Dw 12	DR 11(5)		
A 26(10)	B 22		Dw 13	DR 12(5)		
A 28	B 27		Dw 14	DR 13(6)		
A 29(19)	B 35		Dw 15	DR 14(6)		
A 30(19)	B 37		Dw 16	DR 1403		
A 31(19)	B 38(16)		Dw 17(w 7)	DR 1404		
A 32(19)	B 39(16)		Dw 18(w 6)	DR 15(2)		
A 33(19)	B 40		Dw 19(w 6)	DR 16(2)		
A 34(10)	B 41		Dw 20	DR 17(3)		
A 36	B 42		Dw 21	DR 18(3)		
A 43	B 44(12)		Dw 22			
A 66(10)	B 45(12)		Dw 23	DR 51		
A 68(28)	B 46		Dw 24	DR 52		
A 69(28)	B 47		Dw 25	DR 53		
A 74(19)	B 48		Dw 26			
	B 49(21)					
	B 50(21)					
	B 51(5)					
	B 5102					
	B 5103					
	B 52(5)					
	B 53					
	B 54(22)					
	B 55(22)					
	B 56(22)					
	B 57(17)					
	B 58(17)					
	B 59					
	B 60(40)					
	B 61(40)					
	B 62(15)					
	B 63(15)					
	B 64(14)					
	B 65(14)					
	B 67					
	B 70					
	B 71(70)					
	B 72(70)					
	B 73					
	B 75(15)					
	B 76(15)					
	B 77(15)					
	B 7801					
	Bw 4					
	Bw 6					



HLA クラス I 抗原の構造



HLA クラス II 抗原の構造

図3 HLA 抗原の構造.

表2 HLA 抗原の分類

クラス I 抗原	: HLA-A, -B, -C ⇨細胞傷害性T細胞(キラーT細胞)に抗原提示 HLA-E, -F, -G ⇨明確な機能は不明
クラス II 抗原	: HLA-DR, -DQ, -DP ⇨ヘルパーT細胞に抗原提示
(クラス III 抗原遺伝子: HLA とは機能的に無関係で, 便宜上つけられた名称 補体をコードする遺伝子など: C2, C4, BF)	

表3 HLA 抗原を発現している細胞

クラス I 抗原:	全有核細胞(精子を除く) 血小板 * IFN- α , β , γ , TNF などにより発現増強
クラス II 抗原:	抗原提示細胞 (antigen presenting cell; APC) マクロファージ, 単球, B細胞, ランゲルハンス細胞, 樹状細胞など 活性化T細胞 胸腺上皮細胞 メラノーマ細胞 * IFN- γ や IL-4 で発現増強, 誘導 * プロスタグランジン E で発現抑制

見いだされている(表2). G 抗原は細胞膜上に発現が認められているが, E, F 抗原は細胞膜上には発現が認められておらず, 細胞内のみ発現が認められている. また E, F, G 抗原は多型性に乏しく組織特異的に発現されている点で A, B, C 抗原とは異なっている. G 抗原は妊娠期の栄養芽層 (trophoblast) に発現されていることが最近明らかにされ¹¹⁾¹²⁾, この時期の trophoblast では A, B, C 抗原の発現が抑制されており, G 抗原がこれらの代行としての役割を果たしていると考えられている. すなわち, 胎児は一般的には母親とは HLA アロ抗原特異性が異なっており (semi-allograft), 多型性に富んだ A, B, C 抗原が発現されているが, 母体と接している胎盤側組織である trophoblast には A, B, C 抗原の発現が抑制されており, 母体から免疫学的な攻撃を免れている. そしてその代用として妊娠期には, 遺伝的多型性に乏しい, すなわちアロ抗原とはなりえない G 抗原が発現されており, 細菌やウイルスなどの外敵から胎児を免疫学的に保護しているのではないかと想像されている. 今後これら

の詳細な機能の解明が待たれるところである.

クラス I 抗原 (G 抗原を除く) は, 赤血球, 精子を除くほぼすべての有核細胞の細胞膜において発現しているが, 特にリンパ球系の細胞 (T 細胞, B 細胞) に強く発現が認められている (表3).

2) HLA クラス II 抗原

HLA クラス II 抗原は分子量 33,000~35,000 の α 鎖と分子量 27,000~29,000 の β 鎖の2つの糖ペプチドが非共有結合した細胞膜抗原である(図3). α 鎖は α_1 ドメイン, α_2 ドメイン, TM, CY からなり, β 鎖は β_1 ドメイン, β_2 ドメイン, TM, CY から構成されており, クラス I 抗原と異なり α 鎖, β 鎖ともに TM, CY 領域を持っている. クラス II 抗原では遺伝的多型性, すなわちアロ抗原決定基は β 鎖の β_1 ドメインに集中しているが, DQ 抗原については DQ α 鎖の α_1 ドメインにも存在している. クラス II 抗原の場合, α_2 ドメインおよび β_2 ドメインが免疫グロブリン様構造をとるドメインである. また, 第3の構成鎖として, 分子量

33,000 の Ii 鎖 (invariant chain) が知られている¹³⁾¹⁴⁾ が、これをコードする Ii 鎖遺伝子は第 5 染色体上に存在している。

クラス II 抗原は HLA-DR, DQ, DP 抗原の 3 種類に分類される(表 2)。この他にリンパ球混合培養(mixed lymphocyte culture; MLC) と呼ばれる細胞学的なタイプングにより決定される D 抗原タイプが存在するが、これは特定の D 抗原という HLA タイプが存在するわけではなく、DR 抗原と DQ 抗原の両者(多くの場合 DR 抗原) が D 抗原エピトープを形成していると考えられている。DR, DQ, D アロ抗原は連鎖不平衡の関係にあり互いに強く相関している。

クラス II 抗原はクラス I 抗原と異なり限られた細胞に発現されている(表 3)。すなわち、抗原提示細胞(antigen presenting cell: APC) であるマクロファージ、B 細胞、ランゲルハンス細胞、樹状細胞、あるいは活性化 T 細胞などの免疫系の細胞に特に発現されている。また胸腺上皮細胞やある種の線維芽細胞、内皮細胞、腫瘍細胞(特に悪性黒色腫) などにも発現している。さらにクラス II 抗原は成熟した好中球、赤血球や形質細胞には発現が認められないのに対し、顆粒球やマクロファージコロニー形成細胞(colony forming unit-granulocyte-monocyte; CFU-GM) や赤芽球コロニー形成細胞(colony forming unit-erythroid; CFU-E) などの未分化な骨髄系細胞には発現が認められており、クラス II 抗原が細胞の発生分化になんらかの形で関与していると考えられている。

2. HLA 抗原の遺伝子構造

HLA 抗原遺伝子領域はヒト第 6 染色体短腕上に位

置し¹⁵⁾、進化の過程で遺伝子重複や遺伝子変換を繰り返しながら 3,500 kb (kilobase pair) にわたる巨大な領域を形成してきた¹⁶⁾。これは大腸菌のゲノムのサイズに匹敵する大きさである。このうち約 1,500 kb はクラス I 抗原遺伝子領域、約 1,000 kb はクラス II 抗原遺伝子領域であり、残りは補体(C 2, C 4, Bf 因子)¹⁷⁾ や 21-ヒドロキシラーゼ遺伝子¹⁸⁾ などを含むクラス III 抗原遺伝子領域¹⁹⁾²⁰⁾ とその他の遺伝子から構成されている(図 2)。しかしながら HLA 領域はすべての遺伝子がクローニングされたわけではなく、まだ未知の遺伝子が存在していると考えられる。クラス III 抗原遺伝子とクラス I 抗原遺伝子(HLA-B 抗原遺伝子)間距離は 400 kb あり、すでにクローニングが完了しているが、その領域には 20 個の non-HLA 遺伝子(HLA とは機能的に関係のない遺伝子)、たとえば TNF α , β (tumor necrosis factor α , β) 遺伝子²¹⁾、HSP 70(heat shock protein 70) 遺伝子²²⁾²³⁾、B 144 遺伝子²⁴⁾、BAT (B associated transcript) 遺伝子²⁵⁾²⁶⁾ などが同定されている。表 4 に現在 HLA 領域に認められている遺伝子の数と種類を示した。このようにヒト第 6 染色体短腕上の HLA 領域には HLA 遺伝子に限らず、免疫応答に関与したさまざまな non-HLA 遺伝子が存在していることは非常に興味深く、この領域が生体防御・免疫反応の中核的な役割を担っている重要な遺伝子領域であることを示唆している⁵⁾⁶⁾²⁷⁾。

3. HLA 抗原の機能

HLA 抗原は高度の遺伝的多型性を有し、自己と非自己を識別する標識としての役割を担っている。すなわち、T 細胞が外来抗原を認識する際に抗原のみなら

表 4 HLA 遺伝子領域の遺伝子の数と種類

HLA 遺伝子領域の遺伝子 80 個	発現遺伝子	62 個	クラス I 遺伝子: 6 個 クラス II 遺伝子 α 鎖: 4 個 β 鎖: 4~5 個 クラス III 遺伝子: 5 個* non-HLA 遺伝子: 42 個
	偽遺伝子	18 個	クラス I 遺伝子: 11 個 クラス II 遺伝子 α 鎖: 2 個 β 鎖: 3~5 個** non-HLA 遺伝子: 1 個

*クラス III 遺伝子も non-HLA 遺伝子である
 **種類としては 10 種類の β 鎖偽遺伝子が存在する

ず自己の HLA 産物を同時に認識しなければ T 細胞が活性化されない、いわゆる“MHC 拘束”(altered self 説)に関与することであり、HLA 抗原の遺伝的多型性は自己と非自己を識別するための基礎となる。自己の HLA 抗原を認識する T 細胞レパートリーは発生段階で胸腺において negative selection を受けそのクローンは排除されるため、T 細胞膜上の T 細胞レセプターは自己の HLA 産物を全く認識しない。一方、APC の細胞内でプロセスされ部分消化を受けた外来抗原由来ペプチドと、HLA 抗原が結合することにより生じた HLA 抗原複合体、つまり外来抗原との結合により形状の変化した自己 (altered self) は非自己と認識される。これは、自己ではないが自己の形状に非常に近い構造を有する外来抗原と HLA 抗原との複合体を認識する T 細胞レパートリーは、発生段階で positive selection が働きクローンが拡大されているためである²⁸⁾。すなわち、HLA 抗原の抗原提示と T 細胞認識の関係は発生段階での T 細胞クローンレパートリーの選択に起因している。

つぎに、これら HLA 抗原の機能についてクラス I 抗原、クラス II 抗原別にその詳細について述べてみたい。

1) クラス I 抗原

HLA-A 2 抗原の結晶化 X 線解析による高次立体構造が、1987 年 Bjorkman ら²⁹⁾によって発表された。これによると、A 2 抗原の α_3 ドメインと β_2 ミクログロブリンは 2つの β シート (逆平行 β 構造)を構成し、免疫グロブリンの定常部に類似の構造をとることによりクラス I 抗原の基部を形成している。遺伝的多型性を示す α_1 ドメインと α_2 ドメインはその上部に突出した α ヘリックスの領域と底部に位置する β シートで囲まれた深い溝を形成する(図 4)。この深い溝は、部分消化された外来抗原ペプチドと結合し T 細胞に抗原提示すると考えられている(ホットドッグモデル)。近年、外来抗原ペプチドが HLA 抗原と結合する部位(アミノ酸)および T 細胞が認識する部位(アミノ酸)も分子レベルで同定されている³⁰⁾。すなわち、T 細胞の抗原認識には HLA 抗原、細胞内消化された外来抗原ペプチド、T 細胞レセプターによる 3 分子複合体の形成が必須であることが立証されつつある³¹⁾³²⁾。

クラス I 抗原はほとんど全ての有核細胞の細胞膜上で発現している。細胞に細菌やウイルスなどの外来抗原が感染した際、細胞内で細菌やウイルス遺伝子より mRNA (messenger RNA) が合成され、リボソーム

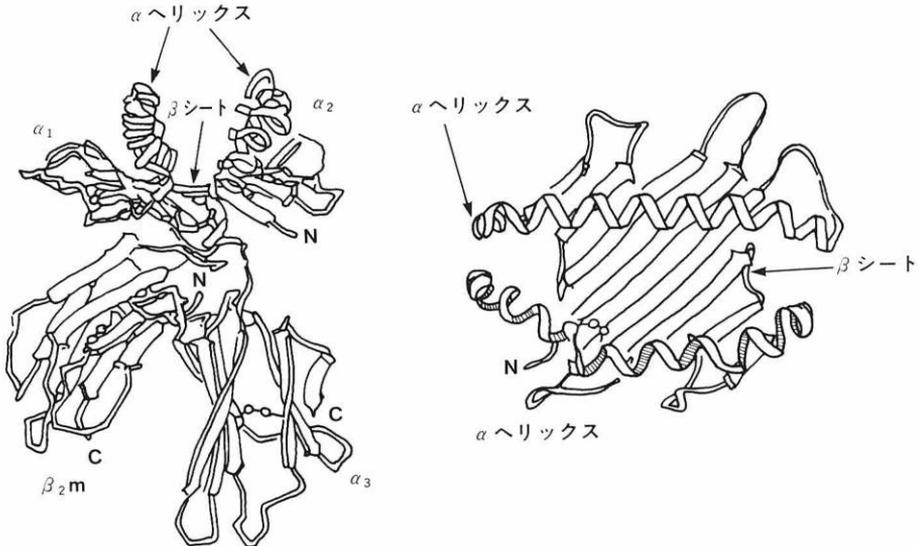


図4 HLA-A2 抗原の立体構造 [文献 29) を改変]。

HLA-A2 抗原の結晶の X 線解析により明らかにされた。(a)は細胞膜上から、(b)は T 細胞レセプター (上部) から眺めた構造を描いたもの。
 α_1 : α_2 ドメイン, α_2 : α_2 ドメイン, α_3 : α_3 ドメイン, β_2m : β_2 ミクログロブリン, N: N 末端, C: C 末端

にて蛋白質へと翻訳される。その後、これらの蛋白質はプロテオソームに移行し、消化され、断片化されたペプチドとなり、小胞体膜上のトランスポーターを介して小胞体内に取り込まれる^{33)~39)}。小胞体内でクラスI抗原が外来抗原ペプチドと結合し、ゴルジ体を経て細胞膜に移動後、細胞膜表面上で細胞傷害性T細胞(CD8⁺T細胞)に抗原提示する(図5)。その結果、細胞傷害性T細胞(キラーT細胞)は感染細胞を標的細胞として攻撃し細胞死に至らしめることにより外来抗原を駆逐・排除する。全ての有核細胞は当然のことながらウイルス、細菌などの外来抗原に細胞内感染を受ける可能性があるので、その様な意味からクラスI抗原が全ての有核細胞で発見されている生物学的意義の重要性が伺える。

2) クラスII抗原

クラスI抗原とクラスII抗原の構造の比較から、クラスI抗原で提唱されたホットドッグモデルがクラスII抗原にも適応されることが推測され、同時に外来抗原ペプチド結合部位(アミノ酸)、T細胞認識部位(アミノ酸)も推測されている¹¹⁾。すなわち、Schwartz³¹⁾の提唱する3分子複合体モデルはクラスII抗原においても適応される。

クラスII抗原はクラスI抗原とは異なりマクロ

ファージ、B細胞といった抗原提示細胞で主に発現されている。外来抗原はクラスI、クラスIIにかかわらず細胞内で消化され短く断片化されたペプチドとしてHLA抗原に結合するが、由来するペプチドの種類、すなわち抗原決定基(エピトープ)によって結合するHLA抗原が異なり、クラスI抗原と結合するペプチド、クラスII抗原と結合するペプチド、両者と結合するペプチドなどがある。いいかえれば、外来抗原の領域(9個~17個のアミノ酸からなるペプチド領域)によって、結合するHLA抗原が決定される。例えば、インフルエンザウイルス由来蛋白にはクラスI抗原に対するエピトープと、クラスII抗原に対するエピトープが別々に存在することが知られている⁴⁰⁾⁴¹⁾。他にも、外来抗原のアミノ酸領域により異なるエピトープが存在し、異なるHLA抗原により認識される例として卵白アルブミン⁴²⁾、ミエリン塩基性蛋白⁴³⁾、リゾチム⁴²⁾⁴⁴⁾、チトクロームC⁴⁵⁾などが知られている。

クラスII抗原は抗原提示する外来抗原の由来がクラスI抗原とは全く異なっている。クラスII抗原と結合する外来抗原は、抗原提示細胞にエンドサイトーシスにより取り込まれ、エンドソーム内で部分消化を受けて断片化されたペプチドとなり、そこでクラスII抗原と結合する。すなわち、クラスII抗原では抗原提示さ

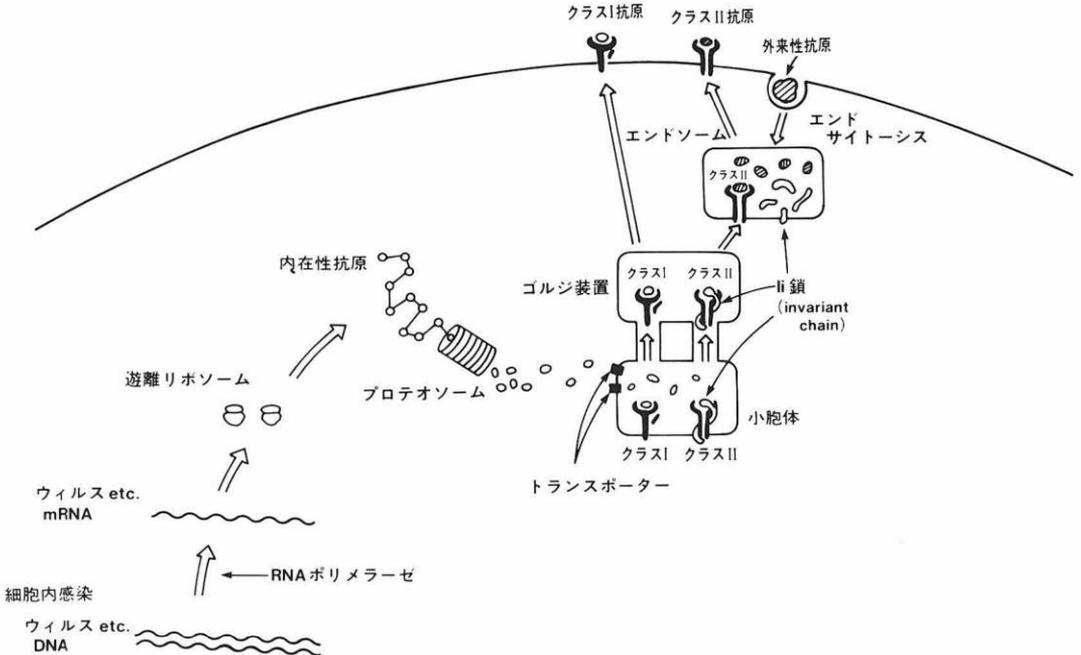


図5 HLA クラスI抗原とクラスII抗原の抗原提示の相違 [文献6)より引用].

れるペプチドフラグメントの生成に関与する細胞がクラス I 抗原とは異なっており、細胞内プロセッシングの経過が両者の間で異なっているといえる。この抗原提示の相違は Ii 鎖に起因していると考えられている¹³⁾¹⁴⁾。すなわち、ゴルジ体・小胞体内で Ii 鎖はクラス II 抗原と結合しており、その結果外来抗原との結合を妨げている内在性抗原（感染により細胞内に侵入してきた抗原）はクラス II 抗原には結合せず、クラス I 抗原特異的に結合し提示される。Ii 鎖はクラス II 抗原のエンドソーム内への移送（局在化）にも関与していると考えられ、クラス II 抗原は Ii 鎖が結合したままエンドソームに移行する。その後、このエンドソーム内の酸性条件下で Ii 鎖が遊離することにより、エンドサイトーシスで細胞表面から取り込んだ外来抗原とクラス II 抗原との結合を可能にする（図 5）。クラス II 抗原により抗原提示された外来抗原ペプチドは CD4⁺T 細胞（ヘルパー T 細胞）に認識されるが、DQ 抗原はヘルパー T 細胞の他にSuppressor T 細胞の誘導にも関与していると考えられている⁴⁶⁾。

4. HLA と疾患感受性

免疫応答が関与しているすべての疾患には何らかの形で HLA がその発症機序に関与していることが疑われる。実際、近年の研究により特定の HLA 抗原が疾患のかかりやすさを遺伝的に規定していることが判明してきた。すなわち、宿主側の要因として HLA 抗原タイプの相違が疾患のかかりやすさを想定していると考えられる。この相関の分子機構として、現段階では次のような 3 通りのモデルが考えられている^{4)~6)}。

1) HLA 抗原がそのタイプ（アロ抗原特異性）により、抗原提示、T 細胞認識の反応性に違いがあり、過剰（または過小）な免疫反応が惹起され、その結果疾患が発症する。

2) HLA は単なる遺伝子マーカーであり、真の疾患感受性（または抵抗性）遺伝子は HLA と連鎖不平衡にある近傍の non-HLA 遺伝子であり、その遺伝子の異常で疾患が発症する。

3) HLA 抗原と外来抗原のアミノ酸配列の相同性により、外来抗原に対して産生された抗体またはキラー T 細胞が交叉反応を起こして自己の HLA 抗原をも攻撃してしまうことにより疾患が発症する（molecular mimicry 説）。

これら 3 通りの可能性は HLA 抗原あるいはその周辺遺伝子が第一義的に疾患発症に関与している場合、すなわち宿主側の HLA 抗原アロタイプの相違が疾患

のかかりやすさを規定している場合のモデルである。しかし、HLA が疾患発症に関与していることは間違いないと考えられるが、ある特定の HLA 抗原との相関は明らかに認められない疾患も数多く存在し、むしろそのような疾患が大半であるということをごここで強調したい。すなわち、疾患発症において、抗原提示、T 細胞認識に HLA 抗原は深く関わっているが、宿主側のもっている HLA 抗原タイプの相違がそれらの免疫反応に影響を及ぼすほど強くはないため、疾患発症に直接関わっていないと考えられる疾患も少なくないのであろう⁴⁾。

III ベーチェット病と HLA

ベーチェット病は眼症状、皮膚症状、口腔内アフタ、外陰部潰瘍を 4 主症状とする全身性慢性疾患である。その病因は未だ解明されていないが、特定の遺伝的背景のもとに何らかの外的環境要因が働いて発症すると考えられている。本病では HLA-B 51 抗原頻度が患者群で著明に増加していることが報告されている^{47)~49)}。しかも、本邦において認められる HLA-B 51 との相関は他の諸外国においても認められており、人種を超えて同一の HLA 抗原と相関する疾患の 1 つとして注目されている。すなわち、本病の分布は HLA-B 51 抗原の分布と一致しており、シルクロードに沿った諸国に多いことから、本病は騎馬民族または古代トルコ民族などにより、シルクロードを経て東西に広まっていったという興味ある仮説が提唱されている⁴⁸⁾。このように民族的な動態を検索する上からも本病は有用な題材を提起しているといえる。

今回、われわれは本病の免疫遺伝学的発症機構をさらに解明するために、ベーチェット病患者を対象に HLA 遺伝子領域の構造解析を分子生物学的手法を用いて試みた。

1. 対象および方法

対象は横浜市大眼科または七沢リハビリテーションセンター内科にて診断された本病患者 85 例で、完全型 39 例、不全型 46 例であった。これらのうち、眼症状を有する患者は 69 例であった。これらと比較検討するため健康者 140 例についても同様に HLA 抗原を検索し、正常対照群とした。

方法は、HLA 抗原の血清学的タイピングは補体依存性リンパ球傷害試験にて施行した⁵⁰⁾⁵¹⁾。

HLA クラス II 抗原遺伝子タイピングは患者末梢血より DNA を抽出し、PCR 法 (polymerase chain reac-

tion法)にて特定のHLA領域のみをサーマルシークエンサーを用いて増幅した。その後、各々の対立遺伝子(タイプ)を特異的に認識する制限酵素で切断し電気泳動することにより得られたバンドパターン(RFLPパターン; restriction fragment length polymorphismパターン)からタイプを決定した(PCR-RFLP法; polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism法)^{52)~55)}。同様に、PCR反応後対立遺伝子(タイプ)特異的な塩基配列に相当する³²P標識合成オリゴヌクレオチド(SSO; sequence specific oligonucleotide)をプローブとしてドットハイブリダイゼーションを行いタイプを決定した(PCR-SSO法; polymerase chain reaction-sequence specific oligonucleotide法)⁵⁶⁾⁵⁷⁾。

一方、TNF β 遺伝子NcoI多型性については、HLAホモ接合体であるB細胞株、AKIBAから作製したコスミド遺伝子ライブラリーより、TNF α をプローブとしてスクリーニングし、pA 713コスミドクローンを分離した。このクローンをEcoRIで消化し、アガロースゲルよりTNF β 領域を含んだ2.4 kb切断フラグメントを分離した。このフラグメントを精製後再びEcoRIとPstIにて消化し、あらかじめ作製しておいたEcoRI/PstI消化CIP(calf intestine phosphatase)処理pUC 19プラスミドベクターに挿入しサブクローニングした(pTB 380-SMと命名)。この組換えプラスミドよりPstI、EcoRI処理して得られる380 bpフラグメント(TNF β の第4エクソン領域を含む)をTNF β プローブとして用いた。一方、サンプルDNAはNcoIで切断後ナイロンフィルターにサザンブロッティングにより転写し、³²Pで標識したプローブを用いたハイブリダイゼーションで得られるバンドパターンからTNF β NcoI切断部位の多型性を解析した(Southern hybridization法)。

また、TNF β 遺伝子のEcoRI多型性の検索には、TNF β 遺伝子3'末端のEcoRI部位をはさむ両側(5'と3'側)のプライマーを作製しPCRを施行した。得られたPCR産物をEcoRIにて消化し電気泳動することによりEcoRI切断部位の有無を調べた。

つぎに、アロ反応性NK細胞に対する感受性の検索には、健康人末梢血よりConray-Ficoll溶液にてリンパ球を分離後、抗CD 3、抗CD 4、抗CD 8モノクローナル抗体およびウサギ補体で処理し、10%HS(human serum)+RPMI 1640液で37°C、1時間培養した。これに40分間マイトマイシンC処理した異なる健康人由

来のリンパ球(アロ)を加え2日間培養した。2日後抗CD 16モノクローナル抗体で処理し、鉄結合抗ヒトIgGマウスIgを加え、30分後マグネット法にてCD 16陽性細胞(アロ反応性NK細胞)のみを集め、インターロイキン2(200 U/ml)存在下にて4日間培養した。一方、4日後にあわせて、患者末梢血より分離したリンパ球を0.5%PHAで刺激し、インターロイキン2(200 U/ml)存在下で3日間培養して標的細胞を準備した。標的細胞[PHA(phytohemagglutinin)刺激患者リンパ球]は 5×10^3 個用い、エフェクター細胞(アロ反応性NK細胞)と標的細胞の最終濃度比を10:1として4時間の⁵¹Cr-release assayを行った。その細胞傷害率よりアロ反応性NK細胞に対する患者リンパ球の感受性を検討した。

2. 結果

1) HLA抗原の血清学的タイピング

HLA抗原の血清学的タイピングの結果は表5に示すごとくであり、HLA-B 51抗原頻度が患者群で著明に増加していた($\chi^2=48.95$, $P<0.001$, R.R.=8.6)。しかし、HLA-B 51とアミノ酸配列が2か所しか異なっていないB 52抗原頻度は両群間で有意差を認めなかった。クラスII抗原ではHLA-DQ 1抗原が患者群で有意に低下していた($\chi^2=13.09$, $P<0.05$, R.R.=0.4)。また、これらの増減は眼症状を有する本症患者で特に強い傾向にあった。

2) HLAクラスII抗原遺伝子タイピング

HLAクラスII抗原遺伝子(HLA-DRB 1、-DQA 1、-DQB 1、-DPB 1遺伝子)ではPc検定(corrected P-value test)で有意差を認める対立遺伝子はなかった。Pc検定より弱い相関をも検出するP検定(P-value test)では、患者群でDRB 1 * 0802対立遺伝子の有意な増加、DQA 1 * 0103対立遺伝子、DQB 1 * 0501対立遺伝子、DQB 1 * 0601対立遺伝子の有意な低下を認めた。これらの増減もまた、眼症状を有する本症患者でより強い傾向にあった(表6)。

3) TNF β 遺伝子

表7に示すように患者群では10.5 kbフラグメント頻度が相対的に増加しており、しかもこの増加は眼症状を有する患者群で有意であった。また、HLA-B抗原とTNF β 遺伝子とは連鎖不平衡の関係があるため、健康対照群で両者の連鎖を検索しその頻度をもとに本病患者のB抗原から期待されるTNF β 対立遺伝子の理論的頻度を算出したところ、患者群、特に眼症状を有する患者群では、対照群の連鎖に歪みをきたして

表5 血清学的 HLA 抗原タイピング

HLA 抗原	対照群 (140例)	患者群 (85例)	完全型 (39例)	不全型			眼症状(+) (69例)
				眼症状(+) (30例)	眼症状(-) (16例)	合計 (46例)	
B 51	20 (14.3%)	50 ⁽¹⁾ (58.8%) ↑↑	25 ⁽²⁾ (64.1%) ↑↑	19 ⁽³⁾ (63.3%) ↑↑	6 (37.5%) ↑	25 ⁽⁴⁾ (54.3%) ↑↑	44 ⁽⁵⁾ (63.8%) ↑↑
DQ 1	99 (70.7%)	39 ⁽⁶⁾ (46.4%) ↓↓	13 ⁽⁷⁾ (33.3%) ↓↓	16 (53.3%) ↓	10 (62.5%)	26 (56.5%) ↓	29 ⁽⁸⁾ (42.6%) ↓↓

(1) $P < 0.001$, R.R.=8.6 (2) $P < 0.001$, R.R.=10.7 (3) $P < 0.001$, R.R.=10.3
 (4) $P < 0.001$, R.R.=7.1 (5) $P < 0.001$, R.R.=10.6
 (6) $P < 0.01$, R.R.=0.4 (7) $P < 0.01$, R.R.= 0.2 (8) $P < 0.01$, R.R.= 0.3

表6 HLA クラスII対立遺伝子タイピング

HLA 対立遺伝子	対照群 (45例)	患者群 (85例)	完全型 (38例)	不全型			眼症状(+) (68例)
				眼症状(+) (30例)	眼症状(-) (17例)	合計 (47例)	
DRB 1 * 0802	1 (2.2%)	14 (16.5%) ↑	4 (10.5%)	6 (20.0%) ↑	4 (23.5%) ↑	10 (21.3%) ↑	10 (14.7%) ↑
DQA 1 * 0103	19 (42.2%)	14 (16.5%) ↓	7 (18.4%) ↓	3 (10.0%) ↓	4 (23.5%)	7 (14.9%) ↓	10 (14.7%) ↓
DQB 1 * 0501	8 (18.6%)	4 (4.7%) ↓	0 (0%) ↓	3 (10.0%)	1 (5.9%)	4 (8.5%)	3 (4.4%) ↓
DQB 1 * 0601	17 (39.5%)	14 (16.5%) ↓	6 (15.8%) ↓	4 (13.3%) ↓	4 (23.5%)	8 (17.0%) ↓	10 (14.7%) ↓

10.5 kb フラグメント頻度が上昇していた。

4) TNFβ 遺伝子の EcoRI 多型性

表8に示すように70例の本病患者および43例の健常者全てにおいて、TNFβ 遺伝子3'末端非翻訳領域にEcoRI 切断部位を持っており、両群間で有意差を認めなかった。

5) アロ反応性NK細胞に対する感受性

表9に示すように、陽性対照群としてのK-562細胞に対し、患者群、対照群ともに感受性は低く、両群間で有意差を認めなかった。

3. 考按

ベーチェット病は以前よりHLA-B 51抗原との相関が知られていたが、単に血清学的レベルで議論されているに過ぎなかった。近年、分子生物学のめざましい進歩によって、HLA 遺伝子領域の構造や機能が次第に明らかにされ、本病とHLA-B 51との関連も遺伝子レベルで解析されるようになってきた。

本病とHLA-B 51との相関機序として、第一にB 51抗原自身が直接疾患発症に関与するという可能性がある。すなわち、HLA-B 51が疾患感受性遺伝子であり、消化された外来抗原ペプチドがT細胞(この場合細胞傷害性T細胞)に抗原提示される際、HLA-B 51に特異的なアミノ酸配列⁵⁸⁾が原因となって、過剰(または過

小)な免疫応答が惹起されて本病が発症するという考えである。われわれは、HLA-B 抗原自身が本病の発症に直接関与すると仮定した場合、インスリン依存性糖尿病^{59)~61)}、慢性関節リウマチ⁶¹⁾、尋常性天疱瘡⁶²⁾、ナルコレプシー⁶³⁾などについて想定されている、HLA抗原の特定のアミノ酸が発症に関与するというモデルと同様に、α1ドメインの63番目のアミノ酸(アスパラギン)と67番目のアミノ酸(フェニルアラニン)が本病の疾患発症に関与しているという可能性を報告しており⁴⁹⁾⁶⁴⁾⁶⁵⁾、今回の検討でも同様の可能性が考えられた。この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(図6)。この仮説では全ての本病患者を説明することはできないが、この2つのアミノ酸残基(一次構造)が抗原提示における三次元構造では単一のエピトープを形成する可能性、また外来抗原の異なった部位(エピトープ)を異なったHLA抗原が認識する可能性がある。したがって、現段階でも無視できない仮説であり今後の研究課題の1つであるといえる。

一方、HLA-B 51は単に遺伝子マーカーであり、真の疾患感受性遺伝子はその近傍のB 51と連鎖不平衡に

表 7 TNFβ 遺伝子の Nco I 多型性

	n	TNFβ 対立遺伝子					
		5.5 kb & 5.5 kb (ホモ)		5.5 kb & 10.5 kb (ヘテロ)		10.5 kb & 10.5 kb (ホモ)	
完全型	33						
観察値		1 (3.0%) ↓	14 (42.4%)	18 (54.5%)			
理論値		(13.3%)	(25.7%)	(61.0%)			
不全型	41						
観察値		3 (7.4%)	13 (31.7%)	25 (61.0%)			
理論値		(13.0%)	(35.3%)	(51.7%)			
眼症状(+)	61						
観察値		1 ⁽¹⁾ (1.6%) ↓↓	22 ⁽²⁾ (36.1%)	38 ⁽²⁾ (62.3%)			
理論値		(12.2%)	(28.4%)	(59.3%)			
眼症状(-)	13						
観察値		3 (23.1%)	5 (38.5%)	5 (38.5%)			
理論値		(17.0%)	(41.7%)	(41.4%)			
患者群合計	74						
観察値		4 (5.4%)	27 (36.5%)	43 (58.1%)			
理論値		(13.1%)	(31.0%)	(55.9%)			
対照群	75						
観察値		8 (10.7%)	27 (36.0%)	40 (53.3%)			

(1) P=0.042, R.R.=0.1 (2) P=0.042, R.R.=7.2

表 8 TNFβ 遺伝子の EcoR I 多型性

	n	TNFβ-1	TNFβ-2
		(188 bp+81 bp+42 bp)	(269 bp+42 bp)
患者群	70	70(100%)	0(0%)
対照群	43	43(100%)	0(0%)

表 9 アロ反応性 NK 細胞に対する感受性

	n	症 例				平均
		1	2	3	4	
患者群	3	0.21%	0%	2.10%		0.77%
対照群	4	2.15%	0.86%	1.22%	2.73%	1.74%
K-562 標的細胞	1	81.55%				81.55%

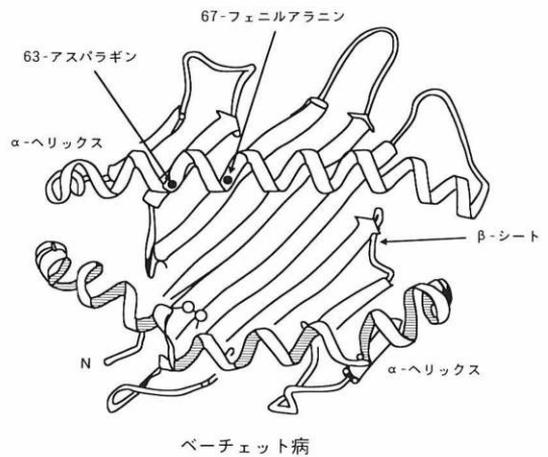


図 6 HLA-B 51 抗原と B 52 抗原のアミノ酸配列の相違.

B 51 と B 52 は共に B 5 のスプリット抗原であり、2 か所のアミノ酸しか異なっていない。すなわち、B 51 抗原に特異的なアミノ酸は α₁ ドメイン 63 番目のアスパラギンと 67 番目のフェニルアラニンであり、これらのアミノ酸の相違が B 細胞病における抗原提示、T 細胞認識に第一義的に関与している可能性もある。

ある non-HLA 遺伝子であって、その遺伝子の異常が本病発症の原因であるという可能性もある。HLA-B 遺伝子とクラス III 遺伝子の間には数多くの non-HLA 遺伝子の存在が知られている⁶⁶⁾。TNFβ 遺伝子は HLA-B 遺伝子の約 250 kb セントロメア側に位置し、HLA-B 抗原と強い連鎖不平衡の関係にある。TNFβ 遺伝子は第 2 イントロン内に NcoI という制限酵素の切断部位の有無で 2 種類の対立遺伝子に分類される。すなわち、NcoI で切断される対立遺伝子は 5.5 kb フ

ラグメントが、また切断されない対立遺伝子は 10.5 kb フラグメントが検出される。しかも、この部位の多型性は第 2 エキソン内の第 26 番目のアミノ酸と相関しており⁶⁷⁾⁶⁸⁾、TNF β 蛋白の産生と関係しているといわれている⁶⁷⁾。すなわち、NcoI 切断部位をもつ対立遺伝子 (genomic Southern hybridization で 5.5 kb のフラグメントが検出される) は 26 番目のアミノ酸がアスパラギンで TNF β の産生能が高く、NcoI 切断部位をもたない対立遺伝子 (genomic Southern hybridization で 10.5 kb のフラグメントが検出される) は 26 番目のアミノ酸がスレオニンであり、TNF β 産生能は低い (表 10)。われわれは NcoI 10.5 kb fragment が本病で有意に上昇していることを見いだしており^{69)~71)}、今回の報告でも同様の結果が導かれている。この相関は特に眼症状を有している患者群で強く、健康人における HLA-B との連鎖不平衡から歪みをきたして生じていた。この結果を説明するには次の 2 通りの可能性が考えられる。まず第一に TNF β 遺伝子そのものがベーチェット病発症に直接関与している可能性であり、TNF β 蛋白産生の低下がサイトカインカスケードに何らかの影響をおよぼして本病を発症させるという考えである。第二の可能性は TNF β 遺伝子も単なる遺伝子マーカーで、真の疾患感受性遺伝子は TNF β 遺伝子近傍の non-HLA 遺伝子であるという考えである。いずれにしろ non-HLA 遺伝子が本病発症に関与している場合、宿主側の HLA 抗原アロタイプの違いは疾患発症には直接関係ないことになる。すなわち、抗原提示においてその反応性に違いはなく、どの HLA アロタイプでも同様に T 細胞に抗原提示されるが、その後 T 細胞が種々の炎症性メディエーターの産生を誘導する際、その遺伝子 (たとえば TNF β 遺伝子などの non-HLA 遺伝子) に異常があるためにその蛋白質が過剰または過小に分泌され、疾患発症に直接関係するという仮説である。

TNF 遺伝子に限らず種々のサイトカインをコードする遺伝子やプロトオンコジーンでは、3'末端の非翻

訳領域がその遺伝子の発現を調節していることが知られているため⁷²⁾、白人で低頻度ではあるが認められている TNF β 遺伝子 3'末端の非翻訳領域の EcoRI 切断部位の多型性⁷³⁾について本邦の健康対照群と患者群で検索してみた。しかし、表 8 に示すように 70 例の本病患者および 40 例の健康者全てにおいて TNF β 3'末端非翻訳領域に EcoRI 切断部位を持っており、両群間で有意差を認めなかった。したがって、この部位は日本人では非多型性と考えられ、この領域は第一義的にベーチェット病発症に関わってはいないと結論された。

CD 3⁺CD 16⁺の細胞群には非特異的に細胞傷害性を有する従来の NK 細胞に加え、特異的に非自己(アロ)を認識し細胞傷害を引き起こす細胞群の存在が近年明らかにされ、アロ反応性 NK 細胞と呼ばれている⁷⁴⁾⁷⁵⁾。またこのアロ反応性 NK 細胞に対する宿主側の感受性 (被傷害性) が個体により異なることが発見され、さらにこの感受性を規定する遺伝子は HLA-C とクラス III 遺伝子の間に位置することも見いだされている⁷⁶⁾。したがって、アロ反応性 NK 細胞に対する感受性と本病との関連性が疑われたが、患者群と対照群の間に有意差は認められなかった。この遺伝子座は第 11 回国際組織適合性ワークショップで Strominger らによって HLA-C 遺伝子そのものあるいはその近傍遺伝子であることが指摘されている。

また、本病における HLA クラス II 遺伝子 (HLA-DRB 1~DRB 5, HLA-DQA 1, HLA-DQB 1, HLA-DPA 1, HLA-DPB 1 対立遺伝子) の軽度の増減は二次的なもので、第一義的には HLA-B 近傍に疾患感受性遺伝子が存在し、その疾患感受性遺伝子との連鎖不平衡によってこれらの増減が生じていると推測される。すなわち、HLA-B 51 とその近傍の疾患感受性遺伝子が座位するハプロタイプが何千年、何万年か以前に発生し、世代を経るごとに組み換えを起こして今日の様なクラス II 対立遺伝子頻度を生じていると考えられる。HLA-B 51 は疾患感受性遺伝子の非常に近くに位

表 10 TNF β 遺伝子の多型性

対立遺伝子	第 1 イントロン内 NcoI 制限酵素断片	第 1 イントロン内 368 番目の塩基	第 3 エキソン内 26 番目のアミノ酸	3'非翻訳領域 EcoRI 制限酵素断片	TNF β の 転写産物および蛋白質
TNF β 1	5.5 kb & 5.0 kb	G	(AAC) アスパラギン	2.4 kb	高産生能
TNF β 2	10.5 kb	C	(ACC) スレオニン	2.4 kb	低産生能

置するため、もしくは疾患感受性遺伝子そのものであるため組み換えが起こりにくく、世代を経ても今日のような強い相関がみられると推測される。現に今回のわれわれの検討によると、クラスII対立遺伝子頻度はB51のような著明な有意差は認められておらず、クラスII遺伝子の軽度の増減はHLA-B51との連鎖不平衡により説明できた。図7はベーチェット病の基本的ハプロタイプを示したものである。なお、HLA-DR5関連の対立遺伝子は日本人では少ないため、われわれはハプロタイプ頻度で有意差を認めていないが、第11回国際組織適合性ワークショップにおけるイタリア人の本病患者では有意に上昇していたハプロタイプであるために付け加えたものである。いずれにしろ、日本以外の他の諸国においても一致して有意な上昇を認められたのはB51だけであった⁷⁷⁾ことは、ベーチェット病の疾患感受性遺伝子はHLA-B近傍に位置しクラスII遺伝子は直接には関与していないことを支持している。

以上の結果より、ベーチェット病、特に眼症状を有するベーチェット病の疾患感受性遺伝子はTNF遺伝子領域近傍に存在することが示唆された。また、ベーチェット病がいくつかの独立した疾患の複合によって

発症する可能性も示唆された。HLA 遺伝子領域は3,500 kbにわたる巨大な領域を形成しており、数多くの non-HLA 遺伝子の存在が示唆されている。しかも、クラスI領域は未だクローニングされていない領域が多く、未知の遺伝子が存在していることはほぼ間違いないと思われる。現にわれわれの検索においても新たに数個のHTF (Hpa II tiny fragment) islands (CpG islands: 発現している housekeeping 遺伝子と90%以上の相関がある⁷⁸⁾)をこの領域に見いだしており、これらの新しい遺伝子の同定とともに、ベーチェット病の原因遺伝子との関連の研究が今後重要な課題となろう。

IV Vogt-小柳-原田病および交感性眼炎とHLA

Vogt-小柳-原田病(以下原田病と略す)は、本邦では全ぶどう膜炎の8%を占め、ベーチェット病、サルコイドーシスと並ぶ3大ぶどう膜炎のひとつである。原田病は急性両眼性汎ぶどう膜炎に、髄膜炎、皮膚の白斑、毛髪の変白、感音性難聴などをともなう原因不明の全身性疾患であり、その発症機構には、メラノサ

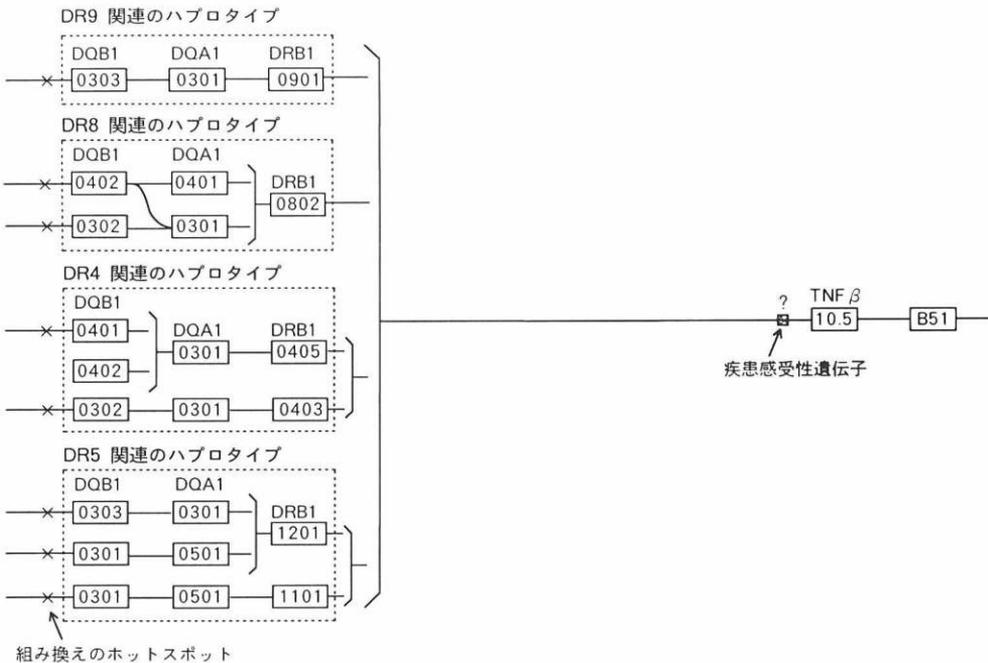


図7 ベーチェット病における基本的 HLA ハプロタイプ [文献4]より引用。
ベーチェット病の疾患感受性遺伝子が TNF 遺伝子のセントロメア側かテロメア側かは現時点では不明である。

イトに対する自己免疫機序が考えられている^{79)~82)}。

1991年に筆者らが行った全国調査での原田病の有病率は人口100万人当たり13.8人、年間の推定発病数は600人、罹患率は人口100万人当たり4.9人である。

原田病の正確な世界的疫学分布は明らかではないが、非常に大きな特徴として、いわゆる有色人種、特に日本人を初めとする東洋人に多く、白人には稀な疾患であるという点が挙げられる⁸³⁾。著者らが以前カリフォルニア大学で行った統計では、東洋人を中心とする有色人種41%、白人21%、スペイン系アメリカ人16%、黒人14%であった。しかもここで白人に分類されているものもその祖先をたどると、東洋人あるいはアメリカインディアンの血が流れているものがほとんどであったという事実は注目に値する。また、われわれは原田病がアメリカやブラジルに移住した日本人にも高頻度に発症が認められるのに対して、ベーチェット病はいわゆるシルクロード沿いの地域に高頻度に見られ、その他の地域では発症頻度が低いこと、さらに、日本に住む日本人にはベーチェット病が高頻度に発症するのに対して、アメリカやブラジルに移住した日本人にはほとんど見られないという点で原田病とは異なっていることを報告してきた。また、原田病患者のHLA血清学的タイピングを行い、HLA-DR 4, DR 53が多いことを世界に先駆けて報告し、原田病はその発症に免疫遺伝学的要因が何らかの形で関与していることを示してきた⁴⁷⁾⁸³⁾⁸⁴⁾⁸⁸⁾。近年組み換えDNA技術のめざましい発展により、HLAのDNAレベルでの解析が可能となり、HLAと疾患感受性の関係が遺伝子レベルで行われるようになった^{59)~63)}。今回、原田病患者のHLAタイピングをDNAレベルで行い、原田病の発症機構について分子レベルでの検索を試みた。一方、交感性眼炎は片眼の穿孔性外傷、内眼手術を機に両眼にぶどう膜炎を発症するという非常にまれな疾患である⁸⁶⁾。その臨床症状は原田病と強い類似性を示すが、原田病とは異なり白人でも症例が報告されており、必ずしも東洋人に多発するという訳ではないようである。したがって、交感性眼炎においてその発症に免疫遺伝学的要因が関与しているとすれば、原田病の素因と同じなのかそれとも全く異なるのかという点は、非常に興味のもたれるところである。そこで症例数は少ないが、交感性眼炎についても原田病と同様に検索し、免疫遺伝学的要因の関与について分子レベルでの検討を加えた。

1. 対象および方法

横浜市大眼科ぶどう膜炎クリニックを受診した原田病患者20例、および交感性眼炎患者5例を対象とした。方法はベーチェット病の場合と同様であり、HLAの血清学的タイピングはNIH標準法による補体依存性リンパ球障害試験にて施行した⁵⁰⁾⁵¹⁾。DNAタイピングはPCR-RFLP法^{52)~55)}により施行した。

2. 結果

1) 原田病

i) 血清学的HLAタイピング

原田病患者20例および対照群43例における血清学的HLAタイピングの結果は、表11に示すようにクラスI抗原では、HLA-B 54が $p=0.003$, R.R.=7.0と正の相関が見られた以外、統計学的に有意差のあるものはみられなかった。クラスII抗原では、実に原田病患者全員にHLA-DR 4, DR 53が認められ、DQ 4にも正の相関が認められた(DR 4: R.R.=57.0, $p<0.00001$, DR 53: R.R.=20.8, $p<0.005$)。一方、DR 6, DR 52, DQ 1には負の相関が認められた(DR 6: R.R.=0.07, $p<0.013$, DR 52: R.R.=0.28, $p<0.025$, DQ 1: R.R.=0.27, $p=0.25$)。

ii) DNAタイピング

PCR-RFLP法により行ったHLAクラスII抗原遺伝子(HLA-DRB 1, -DQA 1, -DQB 1遺伝子)の結果は表12, 表13に示すとおりである。DRB 1領域のDNAタイピングにおいて、原田病患者全例にみられ

表11 原田病患者のHLA-血清学的抗原頻度

HLA 抗原	患者群(20例)	対照群(43例)	相対危険率	P
A 24	13(65.0%)	29(60.9%)		
B 52	1(5.0%)	9(18.8%)		
B 54	10(50.0%)	6(12.5%)	7.0	$<5 \times 10^{-3}$
Cw 1	14(70.0%)	15(31.3%)		
Cw 7	3(15.0%)	14(29.2%)		
DR 1	1(5.0%)	4(8.3%)		
DR 2	3(15.0%)	14(29.2%)		
DR 4	20(100.0%)	20(41.7%)	57.0	$<1 \times 10^{-5}$
DR 5	3(15.0%)	13(27.0%)		
DR 6	1(5.0%)	12(25.0%)		
DR 8	0	5(10.4%)		
DR 9	7(35.0%)	9(18.8%)		
DR 10	0	3(6.3%)		
DR 52	6(30.0%)	29(60.4%)	0.28	$<5 \times 10^{-2}$
DR 53	20(100.0%)	32(66.7%)	20.8	$<5 \times 10^{-3}$
DQ 1	1(5.0%)	4(8.3%)	0.27	$<5 \times 10^{-2}$
DQ 3	12(60.0%)	30(63.8%)		
DQ 4	16(80.0%)	9(18.8%)	15.3	$<5 \times 10^{-5}$

た HLA-DR 4 について特に注目してみた、血清学的タイプングにより DR 4 と判定されるものは、DNA タイピングでは 11 種類のサブタイプ (HLA-DRB 1 * 0401-HLA-DRB 1 * 0411) に分けられる。原田病患者ではこの 11 種類の対立遺伝子のうち実に 95% が DRB 1 * 0405 であり、対照群の 27.9% に比して著明な増加を認め ($p < 0.00001$)、その相対危険率は 32.8

であった。また、DRB 1 * 0405 マイナスのものは、全例が DRB 1 * 0410 であった。また、DRB 1 * 0803 は対照群 18.9% に対して患者群では 0% であり、負の相関を示した ($R.R.=0.10, p=0.047$)。一方、HLA-DQA 領域の DNA タイピングでは、HLA-DQA 1 * 0301 が患者全例に認められ、逆に DQA 1 * 0103 では負の相関がみられた ($DQA 1 * 0301 : R.R.=24.6, p=0.0012, DQA 1 * 0103 : R.R.=0.18, p=0.018$)。次に、HLA-DQB 1 領域の DNA タイピングでは、HLA-DQB 1 * 0401 が患者の 95% に認められ、対照群の 25.9% に対して著明な有意差を認めた ($R.R.=36.8, p < 0.00001$)。また、DQB 1 * 0401 がマイナスの患者は、全例が DQB 1 * 0402 が陽性であり、血清学的タイプングでは 80% の患者が DQ 4 陽性であったが、DNA タイピングの結果では、原田病患者全例が DQ 4 を示す DQB 1 * 0401 あるいは DQB 1 * 0402 をもっていることが明らかになった。また DQB 1 * 0301 には負の相関が認められた。

表 12 原田病患者の HLA-DRB 1 DNA タイピング

DRB 1 遺伝子	患者群(20例)	対照群(43例)	相対危険率	P
DRB 1 * 0101	1(5.0%)	5(11.6%)		
DRB 1 * 1501	1(5.0%)	5(11.6%)		
DRB 1 * 1502	3(15.0%)	10(23.8%)		
DRB 1 * 1602	1(5.0%)	0		
DRB 1 * 0401	0	1(2.9%)		
DRB 1 * 0403	0	4(9.4%)		
DRB 1 * 0405	19(95.0%)	12(27.9%)	32.8	$< 1 \times 10^{-5}$
DRB 1 * 0406	0	4(9.4%)		
DRB 1 * 0408	1(5.0%)	0		
DRB 1 * 0410	2(10.0%)	1(2.5%)		
DRB 1 * 1101	1(5.0%)	3(7.0%)		
DRB 1 * 1201	1(5.0%)	3(7.0%)		
DRB 1 * 1202	1(5.0%)	2(4.7%)		
DRB 1 * 1302	1(5.0%)	6(13.9%)		
DRB 1 * 1401	1(5.0%)	5(11.6%)		
DRB 1 * 1402	1(5.0%)	3(7.0%)		
DRB 1 * 0802	0	1(2.9%)		
DRB 1 * 0803	0	8(18.9%)	0.1	$< 5 \times 10^{-2}$
DRB 1 * 0901	5(20.0%)	11(25.6%)		
DRB 1 * 1001	0	2(4.7%)		

表 13 原田病患者の HLA-DQA 1 および DQB 1 DNA タイピング

DQ 遺伝子	患者群(20例)	対照群(43例)	相対危険率	P
DQA 1 * 0101	4(20.0%)	8(18.6%)		
DQA 1 * 0102	4(20.0%)	11(25.6%)		
DQA 1 * 0103	2(10.0%)	18(41.9%)	0.18	$< 5 \times 10^{-2}$
DQA 1 * 0201	0	1(2.5%)		
DQA 1 * 0301	20(100.0%)	27(62.8%)	24.6	$< 5 \times 10^{-3}$
DQA 1 * 0401	0	1(2.5%)		
DQA 1 * 0501	3(15.0%)	1(2.5%)		
DQA 1 * 0601	0	6(30.0%)		
DQB 1 * 0501	1(5.0%)	8(18.6%)		
DQB 1 * 0502	1(5.0%)	3(7.5%)		
DQB 1 * 0503	0	4(9.3%)		
DQB 1 * 0601	3(15.0%)	15(34.9%)		
DQB 1 * 0602	1(5.0%)	5(11.6%)		
DQB 1 * 0603	0	0		
DQB 1 * 0604	1(5.0%)	6(13.9%)		
DQB 1 * 0301	0	8(18.9%)		
DQB 1 * 0302	5(25.0%)	8(18.9%)		
DQB 1 * 0303	5(25.0%)	12(27.9%)		
DQB 1 * 0401	19(95.0%)	11(25.9%)	36.8	$< 1 \times 10^{-5}$
DQB 1 * 0402	2(10.0%)	3(7.5%)		

2) 交感性眼炎

交感性眼炎は従来から症例数が少なく、今回も 5 例のみであったため統計処理は行わなかった。

i) 血清学的 HLA タイピング

表 14 は交感性眼炎患者 5 例の血清学的タイプングの結果を示したものである。交感性眼炎患者では、HLA クラス I 抗原では HLA-A 24 が全例に認められた。同様に HLA クラス II 抗原では HLA-DR 4, DR 53 が全例に認められた。

ii) DNA タイピング

表 15 は交感性眼炎患者 5 例の DNA タイピングの結果を示したものである。原田病と同様に交感性眼炎患者全例に見られた DR 4 のサブタイプは、5 例中 4 例が HLA-DRB 1 * 0405 であり、残り一例は DRB 1 * 0410 であった。さらに DQA 1 領域では、DQA 1 * 0301 が全例に認められた。また DQB 1 領域では血清学的タイプングでは、DQ 4 は 5 例中 4 例で陽性であったが、DNA タイピングでは交感性眼炎患者全例が

表 14 交感性眼炎患者の HLA 血清学的タイプング

症例	A	B	DR	DR	DQ
1	24, 31	51, 60	52, 53	4, 5	3, -
2	24, 31	46, 54	-, 53	4, 9	3, 4
3	24, -	52, 62	-, 53	2, 4	1, 4
4	11, 24	39, 7	52, 53	4, -	3, 4
5	24, -	61, -	-, 53	4, 9	3, 4

表 15 交感性眼炎患者の DNA タイピング

症例	DRB 1	DQB 1	DQA 1
1	0405/1201	0401/0301	0301/0501
2	0405/0901	0401/0303	0301/0301
3	0405/1502	0401/0601	0301/0103
4	0405/1402	0401/0301	0301/0501
5	0410/0901	0402/0303	0301/0301

DQ 4 を示す DQB 1 * 0401 あるいは DQB 1 * 0402 陽性であった。

3. 考按

原田病は、従来より HLA-DR 4 および DR 53 との相関が示されてきた^{83)~85)87)88)}が、今回われわれの結果でも患者全例に HLA-DR 4, DR 53 が認められ、さらに DQ 4 にも統計学的有意差を認めた。これらのうち、HLA-DR 53 は患者全例に認められたが、これは DR 53 が DR 4, DR 7, DR 9 と連鎖不平衡にあるにもかかわらず、DR 7, DR 9 に統計学的有意差が認められないことから、DR 53 の増加は、DR 4 に連鎖したものと考えられ、DR 53 は原田病の発症には直接関与せず、むしろ HLA-DR 4 および DQ 4 が何らかの形で関与しているのではないかと考えられた。PCR-RFLP 法による DNA タイピングの結果から、原田病患者では DRB 1 領域では DR 4 が、DQB 1 領域では DQ 4 が、そして DQA 1 領域では DQA 1 * 0301 が全例に認められた。DQA 1 * 0301 は原田病患者全例に認められたが、DQA 1 * 0301 は DR 4, DR 9 と連鎖不平衡にあり、DR 9 に有意差がみられないことから DQA 1 * 0301 は DR 4 に連鎖しているための 2 次的上昇と考えられた。DR 4 には 11 種類の対立遺伝子が存在し、DQ 4 には 2 種類の対立遺伝子が存在する。そのうち DR 4 では DRB 1 * 0405 が、DQ 4 では DQB 1 * 0401 が原田病に最も強い相関を示した。また、DRB 1 * 0405 マイナスのものは全例が DRB 1 * 0410 を、DQB 1 * 0401 マイナスのものは DQB 1 * 0402 を有していた。そこで、HLA-DRB 1 鎖のアミノ酸配列を検討してみた。HLA-DRB 1 * 04 において 9~13 は全 DRB 1 * 04 に共通かつ特異的なシーケンスであり、さらに DRB 1 * 0405 および DRB 1 * 0410 の両者に共通かつ特異的なアミノ酸は 57 番目のセリン (Ser) であった。一方、DQB 1 領域では DQB 1 * 0401 および DQB 1 * 0402 に共通の特異的なアミノ酸は 70 番目のグルタミン酸 (Glu), 71 番目のアスパラギン酸 (Asp) であった。さらに、負の相関を示した DRB 1 *

0803 は 57 番目に Ser, 70 番目に Asp をもっていた (表 16, 表 17)。HLA クラス II 抗原の立体構造モデルに照らして検討してみると 57, 70, 71 番目のアミノ酸はいずれも α -ヘリックスに位置し、これらの部位でのアミノ酸変化、とくに中性アミノ酸-酸性アミノ酸の変化は抗原結合部位の立体構造変化をもたらし、抗原ペプチドとの結合 (57 番目, 70 番目, 71 番目) や、T 細胞レセプターの認識 (70 番目) に大きな影響をもたらす事が示されている^{29)~31)35)}(図 8)。原田病に関連した対立遺伝子は、これらの部位にいずれも中性-酸性のアミノ酸変化を伴っていた。このことから、原田病の発症には、DRB 1 鎖のうち DRB 1 * 04 に共通の 9~13 のアミノ酸および 57 Ser, あるいは DQB 1 鎖 70

表 16 DRB 1 のアミノ酸配列

	アミノ酸配列番号						
	9	13	57	70	71	74	86
DRB 1 * 0101	WQ L K F	D	Q	R	A	G	
DRB 1 * 0401	E-V-H	-	-	K	-	-	
DRB 1 * 0402	E-V-H	-	D	E	-	V	
DRB 1 * 0403	E-V-H	-	-	-	E	V	
DRB 1 * 0404	E-V-H	-	-	-	-	V	
DRB 1 * 0405	E-V-H	S	-	-	-	-	
DRB 1 * 0406	E-V-H	-	-	-	E	V	
DRB 1 * 0407	E-V-H	-	-	-	E	-	
DRB 1 * 0408	E-V-H	-	-	-	-	-	
DRB 1 * 0409		H	S	-	K	-	-
DRB 1 * 0410			S	-	-	-	V
DRB 1 * 0411			S	-	-	E	V
DRB 1 * 0803	E Y S T G	S	D	-	L	-	

表 17 HLA-DQB 1 のアミノ酸配列

	アミノ酸配列番号		
	60	70	80
DQB 1 * 0501	YWN S Q K E V L E G A R A S V D R V C R		
DQB 1 * 0502	-----		
DQB 1 * 0503	-----		
DQB 1 * 0601	-----D I	---R T---	E L-T---
DQB 1 * 0602	-----	---T---	E L-T---
DQB 1 * 0603	-----	---T---	E L-T---
DQB 1 * 0604	-----	---R T---	E L-T---
DQB 1 * 0201	-----D I	---R K---	A---T---
DQB 1 * 0301	-----	---R T---	E L-T---
DQB 1 * 0302	-----	---R T---	E L-T---
DQB 1 * 0303	-----	---R T---	E L-T---
DQB 1 * 0401	-----D I	---E D---	T---
DQB 1 * 0402	-----D I	---E D---	T---

Glu および 71 Asp が疾患感受性因子として (図 9, 10), また DRB 1 鎖 70 Asp が疾患抵抗性遺伝子として作用している (図 9) 可能性が考えられた。

原田病は東洋人に多発し, 白人には稀であるという疫学的事実が知られている⁸³⁾, この事実と今回の日本人の原田病において示された DRB 1 * 04, DQB 1 * 04 との相関は, はたしてどのような意味をもつのであろうか, 1991年横浜でおこなわれた第11回国際組織適合性ワークショップでの世界各国の血清学的タイピ

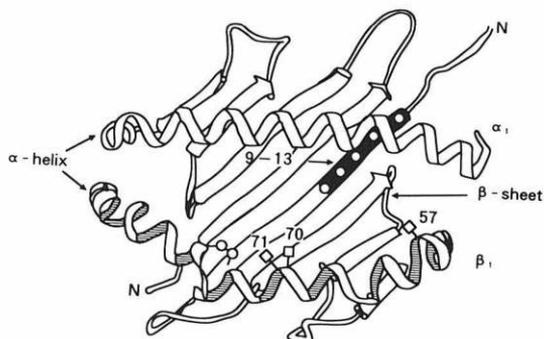


図 8 HLA クラスII抗原の三次元立体構造モデル。
9-13, 57, 70, 71は, それぞれ原田病に関連するアミノ酸の位置を示す。

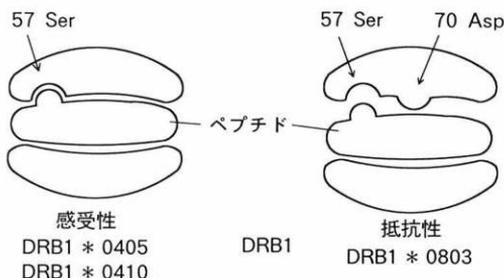


図 9 原田病の疾患感受性および抵抗性遺伝子のホットドッグモデル。

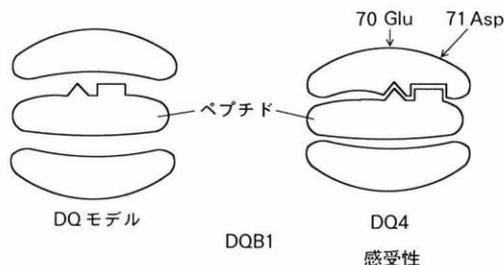


図 10 原田病の疾患感受性遺伝子のホットドッグモデル。

ングおよび一部の地域で行われた DNA タイピングの結果を分析し, 原田病の疾患感受性遺伝子の関係を検討してみたところ非常に興味深い事実が判明した⁸⁹⁾, すなわち原田病に相関する DR 4 は全世界で認められるが, 日本人, 中国人, 朝鮮人などの東洋人と白人ではそのサブタイプが異なることが示された, すなわち DR 4 の 11 の対立遺伝子のうち東洋人においては, DRB 1 * 0405 および DRB 1 * 0406 が主たる対立遺伝子であるのに対し, 白人では DRB 1 * 0405 は非常に稀な対立遺伝子であり, DRB 1 * 0401 および DRB 1 * 0404 が主たる対立遺伝子であった, また HLA-DR 4 に連鎖する DQ 抗原も, 東洋人では DQ 4 である DQB 1 * 0401 あるいは DQB 1 * 0402 がほとんどであるのに対し, 白人では, DQ 7 である DQB 1 * 0301 あるいは DQ 8 である DQB 1 * 0302 であり, 人種によって大きく異なることが示された, HLA-DQ 4 は日本人では主に DR 4 である DRB 1 * 0405, DRB 1 * 0410 以外には, DR 8 である DRB 1 * 0802 にも連鎖しているがこの頻度は低い, これに対し, 白人では DQ 4 は DR 8 である DRB 1 * 0802 に連鎖している, このように東洋人と白人の HLA-DR 4 のサブタイプおよび連鎖する DQ 抗原は大きく異なっており, 原田病患者にみられた HLA ハプロタイプが東洋人特有であった事は, 原田病が東洋人に多発し白人では稀であるという事実と一致し, 非常に興味深い, 今回の結果からは, 原田病の分子遺伝学的発症機構において HLA-DR 抗原, DQ 抗原のどちらが疾患感受性により強く関与しているのか, あるいは DR 4-DQ 4 のハプロタイプが疾患感受性に関与しているのかを結論づけることはできなかった, 今後, 日本人とは DR 抗原, DQ 抗原の連鎖が異なる他の民族で HLA の検索が行われれば, 原田病の疾患感受性因子の解明が近い将来に可能なものと期待される。

交感性眼炎については, 今回症例数も少なく統計学的処理を行うには至らなかったが, HLA 頻度からみた免疫遺伝学的発症素因は原田病と酷似していた, すなわち交感性眼炎患者においても DR 抗原では DRB 1 * 0405 あるいは DRB 1 * 0410 が, そして DQ 抗原では DQB 1 * 0401 あるいは DQB 1 * 0402 が患者全例に認められた, 原田病と交感性眼炎は発症の契機は異なるにもかかわらず, 少なくとも日本人では同一の免疫遺伝学的素因が重要な役割をはたしていると考えられた, したがって今後, 例えば穿孔性外傷を受けた患者が HLA タイピングによって DR 4, DQ 4 を

持っていた場合には、交感性眼炎を発症する可能性があることを予知できるとともに、本疾患の予防、早期診断、さらには治療にも貢献できるものと考えられる。

今回の成績から、原田病の発症においてその背景に存在する免疫遺伝学的要因の重要性がより一層明らかになるとともに、交感性眼炎についても日本人に関する限り原田病と同一の免疫遺伝学的発症機構が存在することが明らかとなった。

稿を終えるにあたり、宿題報告の機会を与えて下さいました日眼評議員、日眼会員の皆様深く感謝いたします。また、長年にわたってご指導、ご教示を賜りました恩師杉浦清治北大前教授に深甚なる謝意を表します。また、これまでの研究を支えていただいた北大松田英彦教授、札幌市青木功喜博士、順天堂大中島 章名誉教授をはじめ、横浜市大眼科同門会、神奈川県眼科医会の諸先生に厚く御礼申し上げます。なお、本研究には文部省科学研究費補助金、厚生省特定疾患調査研究班、横浜市特定研究事業『難病』研究班、および木原記念横浜生命科学振興財団の補助を受けた。記して謝意を表します。

文 献

- 1) **Snell GD, Stimpfling JF**: In biology of the laboratory mouse. In: Green EL (Ed): Genetics of Tissue Transplantation (2nd ed), McGraw-Hill, New York, 457—491, 1966.
- 2) **Benacerraf B, McDevitt HO**: Histocompatibility-linked immune response genes. *Science* 175: 273—279, 1972.
- 3) **Benacerraf B**: Role of MHC gene products in immune regulation. *Science* 212: 1229—1238, 1981.
- 4) **水木信久, 大野重昭**: ぶどう膜炎とHLA. *眼科* 34: 111—126, 1992.
- 5) **水木信久, 大野重昭**: HLA 抗原遺伝子の構成と眼疾患との関連. *日眼会誌* 96: 417—431, 1992.
- 6) **水木信久, 大野重昭**: HLA の分子生物学. *あたらしい眼科* 9: 589—605, 1992.
- 7) **Zijlstra M, Bix M, Simister NE, Loring JM, Raulet DH, Jaenisch R**: β_2 -Microglobulin deficient mice lack CD4⁺ cytolytic T cells. *Nature* 344: 742—746, 1990.
- 8) **Koller BH, Geraghty DE, Shimizu Y, Demars R, Orr HT**: HLA-E, a novel HLA class I gene expressed in resting T lymphocytes. *J Immunol* 141: 897—904, 1988.
- 9) **Geraghty DE, Wei X, Orr HT, Koller BH**: Human leukocyte antigen F (HLA-F), an expressed HLA gene composed of a class I coding sequence linked to a novel transcribed repetitive element. *J Exp Med* 171: 1—18, 1990.
- 10) **Geraghty DE, Koller BH, Orr HT**: A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 9145—9149, 1987.
- 11) **Ellis SA, Palmer MS, McMichael AJ**: Human trophoblast and the choriocarcinoma cell line BeWo express a truncated HLA class I molecule. *J Immunol* 144: 731—735, 1990.
- 12) **Wei X, Orr HT**: Differential expression of HLA-E, HLA-F, and HLA-G transcripts in human tissue. *Human Immunol* 29: 131—142, 1990.
- 13) **Long EO**: Intracellular traffic and antigen processing. *Immunol Today* 10: 232—234, 1989.
- 14) **Peterson M, Miller J**: Invariant chain influences the immunological recognition of MHC class II molecules. *Nature* 345: 172—174, 1990.
- 15) **Olaisen B, Sakaguchi AY, Naylor SL**: Report of the committee on the genetic constitution of chromosomes 5 and 6. *Cytogenet Cell Genet* 46: 147—169, 1987.
- 16) **Lawrance SK, Smith CL, Srivassava R, Cantor CR, Weissman SM**: Megabasescale mapping of the HLA gene complex by pulsed field gel electrophoresis. *Science* 235: 1387—1390, 1987.
- 17) **Carroll MC, Campbell RD, Bentley DR, Porter RR**: A molecular map of the human major histocompatibility complex class III region linking complement genes C4, C2 and factor B. *Nature* 307: 237—241, 1984.
- 18) **White PC, Grossberger D, Onufer BJ, Chaplin DD, New MI, Dupont B, et al**: Two genes encoding steroid 21-hydroxylase are located near the genes encoding the fourth component of complement in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 1089—1093, 1985.
- 19) **Carroll MC, Katzman P, Alicot EM, Koller BH, Geraghty DE, Orr HT, et al**: Linkage map of the human major histocompatibility complex including the tumor necrosis factor genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 8535—8539, 1987.
- 20) **Dunham I, Sargent CA, Trowsdale J, Campbell RD**: Molecular mapping of the human major histocompatibility complex by pulsed-field gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 7237—7241, 1987.
- 21) **Nedwin GE, Naylor SL, Sakaguchi AY, Smith D, Jarrett-Nedwin J, Pennica D, et al**:

- Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes; structure, homology and chromosomal localization. *Nucl Acad Res* 13: 6361-6373, 1985.
- 22) **Milner CM, Campbell RD**: Structure and expression of the three MHC-linked Hsp 70 genes. *Immunogenetics* 32: 242-251, 1990.
- 23) **Hunt C, Morimoto RI**: Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 6455-6459, 1985.
- 24) **Tsuge I, Shen FW, Steinmetz M, Boyse EA**: A gene in the H-2S: H-2D interval of the major histocompatibility complex which is transcribed in B cell and macrophages. *Immunogenetics* 26: 378-380, 1987.
- 25) **Spies T, Blanck G, Bresnahan M, Sands J, Strominger JL**: A new cluster of genes within the human major histocompatibility complex. *Science* 243: 214-217, 1989.
- 26) **Banerji J, Sands J, Strominger JL, Spies T**: A gene pair from the human major histocompatibility complex encodes large proline-rich proteins with multiple repeated motifs and a single ubiquitin-like domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 2374-2378, 1990.
- 27) **Trowsdale J, Ragoussis J, Campbell RD**: Map of the human MHC. *Immunol Today* 12: 443-446, 1991.
- 28) 安部 良: T細胞の分化とトレランス. *Annual Rev 免疫* 1990: 16-24, 1990.
- 29) **Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC**: Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329: 506-512, 1987.
- 30) **Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC**: The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 329: 512-518, 1987.
- 31) **Schwartz RH**: T-lymphocyte recognition of antigen in association with gene products of the major histocompatibility complex. *Ann Rev Immunol* 3: 237-261, 1985.
- 32) **Rothbard JB**: Major histocompatibility complex-peptide interactions. *Curr Opin Immunol* 2: 99-105, 1989.
- 33) **Deverson EV, Gow IR, Coadwell WJ, Monaco JJ, Butcher GW, Howard JC**: MHC class II region encoding proteins related to the multi-drug resistance family of transmembrane transporters. *Nature* 348: 738-741, 1990.
- 34) **Trowsdale J, Hanson I, Mockridge I, Beck S, Townsend A, Kelly A**: Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the 'ABC' superfamily of transporters. *Nature* 348: 741-743, 1990.
- 35) **Spies T, Bresnahan M, Bahram S, Arnold D, Blanck G, Mellins E, et al**: A gene in the human major histocompatibility complex class II region controlling the class I antigen presentation pathway. *Nature* 348: 744-747, 1990.
- 36) **Brown MG, Driscoll J, Monaco JJ**: Structural and serological similarity of MHC-linked LMP and proteasome (multicatalytic proteinase) complexes. *Nature* 353: 355-357, 1991.
- 37) **Glynn R, Powis SH, Beck S, Kelly A, Kerr LA, Trowsdale J**: A proteasome-related gene between the two ABC transporter loci in the class II region of the human MHC. *Nature* 353: 357-360, 1991.
- 38) **Monaco JJ**: Molecular model of MHC class I-restricted antigen processing. *Immunol Today* 13: 173-179, 1992.
- 39) **Neefjes JJ, Ploegh HL**: Intracellular transport of MHC class II molecules. *Immunol Today* 13: 179-184, 1992.
- 40) **Eckels DD, Sell TW, Bronson SR, Johnson AH, Hartzman RJ, Lamb JR**: Human helper T cell clones that recognize different influenza hemagglutinin determinants are restricted by different HLA-D region epitopes. *Immunogenetics* 19: 409-423, 1984.
- 41) **Sweetser MT, Morrison LA, Braciale VL, Braciale TJ**: Recognition of preprocessed endogenous antigen by class I but not class II MHC-restricted T cells. *Nature* 342: 180-182, 1989.
- 42) **Roof RW, Luescher IF, Unanue ER**: Phospholipids enhance the binding of peptides to class II major histocompatibility molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1735-1739, 1990.
- 43) **Zamvil SS, Mitchell DJ, Moore AC, Kitamura K, Steinman L, Rothbard JB**: T-cell epitope of the autoantigen myelin basic protein that induces encephalomyelitis. *Nature* 324: 258-260, 1986.
- 44) **Donermeyer DL, Allen PM**: Binding to Ia protects an immunogenic peptide from proteolytic degradation. *J Immunol* 142: 1063-1068, 1989.
- 45) **Srinivasan M, Pierce SK**: Isolation of a functional antigen-Ia complex. *Proc Natl Acad Sci*

- USA 87: 919—922, 1990.
- 46) **Hirayama K, Matsushita S, Kikuchi I, Iuchi M, Ohta N, Sasazuki T, et al:** HLA-DQ is epistatic to HLA-DR in controlling the immune response to schistosomal antigen in humans. *Nature* 327: 426—430, 1987.
 - 47) **大野重昭:** 宿題報告(II). 眼科における免疫の諸問題. 眼疾患と免疫遺伝素因について. *日眼会誌* 83: 1875—1908, 1979.
 - 48) **Ohno S, Ohguchi M, Hirose S, Matsuda H, Wakisaka A, Aizawa M:** Close association of HLA-Bw51 with Behçet's disease. *Arch Ophthalmol* 100: 1455—1458, 1982.
 - 49) **水木信久, 大野重昭, 鎌田光二, 中村 聡, 石原麻美, 佐藤 薫, 他:** ベーチェット病における免疫遺伝学的発症機構. *日眼会誌* 95: 783—789, 1991.
 - 50) **Terasaki PI, McClelland JD:** Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* 204: 998—1000, 1964.
 - 51) **Terasaki PI:** Histocompatibility Testing 1980. UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, 1980.
 - 52) **Ota M, Seki T, Nomura N, Sugimura K, Mizuki N, Fukushima H, et al:** Modified PCR-RFLP method for HLA-DPB1 and -DQA1 genotyping. *Tissue Antigens* 38: 60—71, 1991.
 - 53) **Nomura N, Ota M, Tsuji K, Inoko H:** HLA-DQB1 genotyping by modified PCR-RFLP method combined with allele-specific primers. *Tissue Antigens* 38: 53—59, 1991.
 - 54) **Ota M, Seki T, Fukushima H, Tsuji K, Inoko H:** HLA-DRB1 genotyping by modified PCR-RFLP method combined with group-specific primers. *Tissue Antigens* 39: 187—202, 1992.
 - 55) **Mizuki N, Ohno S, Sugimura K, Saeki T, Kikuchi YY, Ando A, et al:** PCR-RFLP is as sensitive and reliable as PCR-SSO in HLA class II genotyping. *Tissue Antigens* 40: 100—103, 1992.
 - 56) **Erlich HA:** PCR Technology, The Stockton Press, New York, 1989.
 - 57) **Bugawan TL, Begovich AB, Erlich HA:** Rapid HLA-DPB typing using enzymatically amplified DNA nonradioactive sequence-specific oligonucleotide probes. *Immunogenetics* 32: 231—241, 1990.
 - 58) **Hayashi H, Ennis PD, Ariga H, Salter RD, Parham P, Kano K, et al:** HLA-B51 and HLA-Bw52 differ by only two amino acids which are in the helical region of the α 1 domain. *J Immunol* 142: 306—311, 1989.
 - 59) **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.
 - 60) **Thomson G:** HLA disease associations; models for insulin dependent diabetes mellitus and the study of complex human genetic disorders. *Ann Rev Genet* 22: 31—50, 1988.
 - 61) **Todd JA, Acha-Orbea H, Bell JI, Chao N, Fronek Z, Jacob CO, et al:** A molecular basis for MHC class II-associated autoimmunity. *Science* 240: 1003—1009, 1988.
 - 62) **Scharf SJ, Friedmann A, Brautbar C, Szafer F, Steinman L, Horn G, et al:** HLA class II allelic variation and susceptibility to pemphigus vulgaris. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 3504—3508, 1988.
 - 63) **松本一雅, 十字猛男, 本田 裕:** ナルコレプシーのDNA解析. *Medical Immunol* 16: 957—961, 1988.
 - 64) **Mizuki N, Ohno S, Tanaka H, Sugimura K, Seki T, Ando A, et al:** Association of HLA-B51 and lack of association of class II alleles with Behçet's disease. *Tissue Antigens* 40: 22—30, 1992.
 - 65) **Mizuki N, Ohno S, Mizuki N, Tanaka H, Kera J, Tsuji K, et al:** HLA serological and DNA typing of Behçet's disease and its primary association with B51. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (in press).
 - 66) **Sargent CA, Dunham I, Campbell RD:** Identification of multiple HTF-island associated genes in the human major histocompatibility complex class III region. *EMBO J* 8: 2305—2312, 1989.
 - 67) **Abraham LJ, Du DC, Zahedi K, Dawkins RL, Whitehead AS:** Haplotypic polymorphisms of the TNF β gene. *Immunogenetics* 33: 50—53, 1991.
 - 68) **Messer G, Spengler U, Jung MC, Honold G, Blomer K, Pape GR, et al:** Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: An NcoI polymorphism in the first intron of the human TNF- β gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF- β production. *J Exp Med* 173: 209—219, 1991.
 - 69) **Mizuki N, Ohno S, Mizuki N, Sugimura K, Nakamura S, Tanaka H, et al:** Searching for the gene(s) within the HLA region responsible for the susceptibility to Behçet's disease. *Chibret Int J Ophthalmol* (in press).
 - 70) **Mizuki N, Inoko H, Sugimura S, Nishimura**

- K, Nakamura S, Tanaka H, et al:** RFLP analysis in the TNF β gene and the susceptibility to NK cells in Behçet's disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (in press).
- 71) **Mizuki N, Ohno S:** Molecular genetic studies on Behçet's disease. *Proceedings of the 3rd International Symposium on Uveitis, Amstelveen, Kugler Publications, (in press).*
- 72) **Brown JHT, Beutler B:** Endotoxin-responsive sequences control cachectin/tumor necrosis factor biosynthesis at the translation level. *J Exp Med* 171: 465-475, 1990.
- 73) **Partanen J, Koskimies S:** Low degree of DNA polymorphism in the HLA-linked lymphotoxin (tumor necrosis factor β) gene. *Scand J Immunol* 28: 313-316, 1988.
- 74) **Ciccione E, Pende D, Viale O, Tambussi G, Ferrini S, Biassoni R, et al:** Specific recognition of human CD3⁻CD16⁺ natural killer cells requires the expression of an autosomic recessive gene on target cells. *J Exp Med* 172: 47-52, 1990.
- 75) **Suzuki N, Suzuki T, Engleman EG:** Evidence for the involvement of CD56 molecules in alloantigen-specific recognition by human natural killer cells. *J Exp Med* 173: 1451-1461, 1991.
- 76) **Ciccione E, Colonna M, Viale O, Pende D, Donato CD, Reinharz D, et al:** Susceptibility or resistance to lysis by alloreactive natural killer cells is governed by a gene in the human major histocompatibility complex between BF and HLA-B. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 9794-9797, 1990.
- 77) **Mizuki N, Inoko H, Tsuji K, Ding T, Ohno S:** Behçet's disease. In: Tsuji K (Ed): *HLA in 1991*. Oxford University Press, New York, (in press).
- 78) **Bird AP:** CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321: 209-213, 1986.
- 79) **Sugiura S:** Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Jpn J Ophthalmol* 22: 9-35, 1978.
- 80) 杉浦清治: Vogt-小柳-原田病. *臨眼* 38: 1001-1008, 1979.
- 81) 大野重昭, 小竹 聡: 原田病と免疫. *あたらしい眼科* 3: 1541-1547, 1986.
- 82) **Sakamoto T, Murata T, Inomata H:** Class II major histocompatibility complex on melanocytes of Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Arch Ophthalmol* 109: 1270-1274, 1991.
- 83) **Ohno S:** Immunological aspects of Behçet's and Vogt-Koyanagi-Harada's diseases. *Trans Ophthalmol Soc UK* 101: 335-341, 1981.
- 84) **Ohno S, Char DH, Kimura SJ, O'Connor GR:** Vogt-Koyanagi-Harada syndrome. *Am J Ophthalmol* 83: 735-740, 1977.
- 85) **Zhao M, Jian Y, Abrahams W:** Association of HLA antigens with Vogt-Koyanagi-Harada syndrome in a Han Chinese population. *Arch Ophthalmol* 109: 368-370, 1991.
- 86) **Marak GE Jr:** Recent advances in sympathetic ophthalmia. *Surv Ophthalmol* 24: 141-156, 1979.
- 87) 新藤裕実子, 大野重昭: 原田病. *あたらしい眼科* 8: 1191-1196, 1991.
- 88) **Shindo Y, Inoko H, Yamamoto T, Tsuji K, Ohno S:** Immunogenetic mechanism of Vogt-Koyanagi-Harada's disease. In: Shimizu K (Ed): *Current Aspects in Ophthalmology*. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, 1992 (in press).
- 89) **Wakisaka A:** Anthropological analysis. In: Tsuji K, et al (Eds): *HLA in 1991*. Oxford University Press, New York, (in press).