

ベーチェット病の感受性遺伝子探索と機能解明

横浜市立大学附属病院 リウマチ血液感染症内科 講師 桐野 洋平



背景

ベーチェット病は眼や皮膚粘膜などに発作的な炎症を繰り返す難治性疾患である。HLA-B*51が既知の遺伝素因として知られていたが、その他の感受性遺伝子は不明だった。最近日本人とトルコ人のDNAを用いたゲノムワイド関連解析 (GWAS) を通じて新規感受性遺伝子が複数見つかった。これらの遺伝子のベーチェット病における役割を明らかにして、新しい治療法を開発することが本研究の目標である。難病医学研究財団より助成金を頂き、疾患感受性遺伝子の一つであるケモカイン受容体CCR1の機能解析に着手した。CCR1はMIP1 α やRANTESなどの細胞遊走因子に対する細胞膜受容体であり、単球に主に発現している。不思議なことにベーチェット病ではCCR1の発現量が低いことと単球の遊走能が低いことが疾患発症のリスクとなる。我々は以前より単球やマクロファージの機能解析を行っており実験系が確立していたことから、まずCCR1の機能解析を推進した。最近マクロファージにはM1とM2という2つのサブセットが存在して、特にM2マクロファージはIL-10という抗炎症性サイトカインを産生することから注目を集めている。ちなみにIL-10もベーチェット病の感受性遺伝子である。

方法

本研究は横浜市立大学附属病院の倫理委員会の承認を得ており、同意書を書面で取得した後に検体を採取した。健常人およびベーチェット病患者より血液を採取し、フィコール法にて末梢血単核細胞を遠心分離した (図1)。この細胞をマグネットビーズ付加抗体 (MACS, Myltenyi Biotec) にて処理し、単球を分離した。分離した単球はM-CSFおよびGM-CSFという異なるサイトカインの存在下でそれぞれ9日間培養した。この培養法はM1 (GM-CSF) とM2 (M-CSF) マクロファージの分化法として標準的なものである。培養後、これらのマクロファージよりcDNAを作製してreal-time PCR法にてCD163、HO-1、FTH (H鎖フェリチン)、およびCCR1の発現解析、フローサイトメトリーにてCD68⁺CCR1⁺細胞数、培養上清のサイトカインをBD CBAアッセイにて測定した。解析はGraph Pad prismを用いて行った。

結果

まずM1およびM2マクロファージにおけるmRNAの発現を確認した。M1・M2マクロファージのM2マーカーとされるCD163、HO-1、H鎖フェリチン (FTH) を健常人単球由来のマクロファージで確認したところ、予想通りいずれもM2に多く発現していた。またCCR1もM2分画に多く発現していた (図2)。

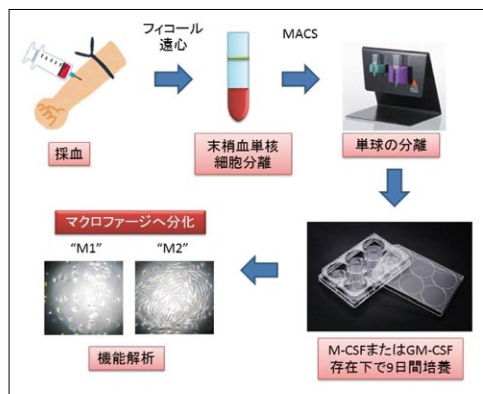


図1 実験方法の流れ

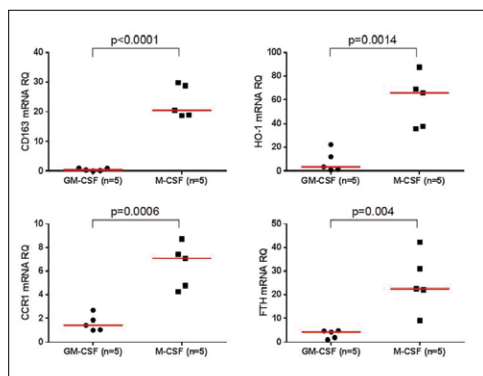


図2 健常人由来単球のGM-CSF (M1)・M-CSF (M2) によるマクロファージへの分化誘導とmRNAの結果

次にフローサイトメトリーを用いて、CCR1蛋白の発現がM2マクロファージに高発現しているか検討した。M1M2に関わらずマクロファージのマーカであるCD68でゲートし、CD163とCCR1発現を調べた。図3で示すようにM2マクロファージのマーカであるCD163はM2に多いことが確認でき、誘導実験の妥当性が示された。また図2で示したmRNA同様M2分画でCCR1が多いことが確認された。HCとBD間での差は検出できなかった。

最後にM1・M2マクロファージをそれぞれ10ug/mlのリポポリサッカライド(LPS)にて24時間刺激して、TNF- α 、IL-6、IL-10の産生を調べた(図3)。期待通りIL-10はM2細胞で有意に多く産生され、IL-6はM1で高い傾向を認めた。TNF- α には差を認めなかった。今回の検討ではHCとBDの間に炎症性サイトカイン産生に有意差を認めなかった。

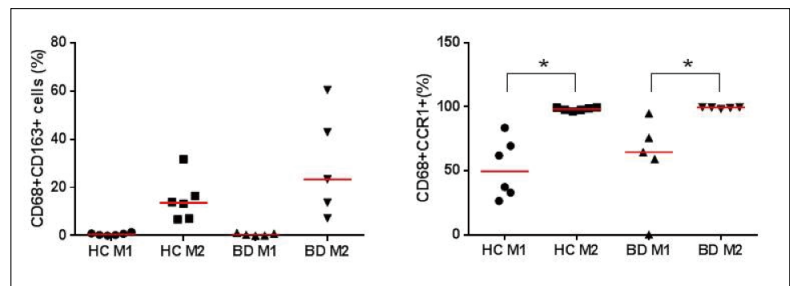


図3 健康人とパーチェット病患者におけるM1およびM2マクロファージのフローサイトメトリー解析。HCは健康人、BDはパーチェット病を示す。*はP<0.05。

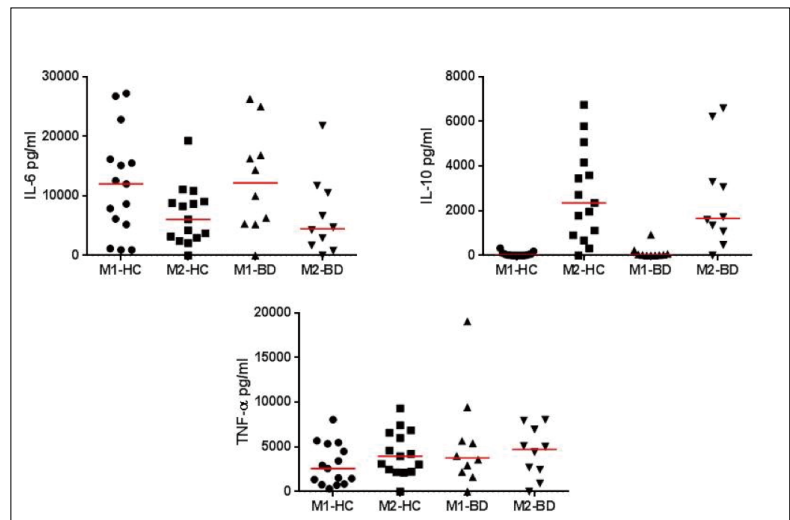


図4 健康人とパーチェット病患者由来M1M2マクロファージのサイトカイン産生の比較

考察・結論

以上の検討から、疾患感受性遺伝子であるCCR1はM2マクロファージに多く発現していることが判明した。CCR1発現が低いことがBDのリスクとなる理由はいままで不明であった。本研究を通じて、抗炎症作用をもつM2マクロファージのCCR1発現がパーチェット病では低いことで、炎症局所への細胞遊走も低下し、IL-10などを介したM2マクロファージの抗炎症作用が発揮できていない可能性が考えられた。今後はさらに症例数を増やし、細胞遊走能の違い、薬剤の影響、CCR1を遺伝子的に増加またはノックダウンする実験などを通じてさらに詳しい研究成果を報告していきたい。また、次世代シーケンサーを用いた新たな疾患感受性遺伝子の解析にも着手しており、パーチェット病家族例で興味深い遺伝子が候補に挙がっている。こちらの研究も推進していきたい。

謝 辞

本研究を支えて頂いた難病財団および寄付者の方々、研究に参加頂いた患者様、研究を実施した横浜市立大学大学院仲野寛人先生、東谷佳奈さんに御礼申し上げます。

論 文

Kirino Y, Remmers EF. Genetic architectures of seropositive and seronegative rheumatic diseases. Nat Rev Rheumatol, 2015, in press.