

## 博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名          水木   悠喜

横浜市立大学大学院医学研究科   視覚器病態学

### 審   査   員

主   査	横浜市立大学大学院医学研究科	産婦人科学	教授	宮城   悦子
副   査	横浜市立大学大学院医学研究科	口腔外科学	教授	光藤   健司
副   査	横浜市立大学大学院医学研究科	遺伝学	准教授	水口   剛

## 博士の学位論文審査結果の要旨

The influence of *HLA-B\*51* on clinical manifestations among Japanese patients with Behçet's disease: A nationwide survey

(日本人ベーチェット病患者の臨床症状に対する *HLA-B\*51* の影響を対象とした全国調査)

### 研究内容の要旨

ベーチェット病は全身の諸臓器に急性の炎症を繰り返す原因不明の難治性炎症性疾患である。疫学的調査として、*HLA-B\*51* が日本人のベーチェット病患者の臨床症状に与える影響について厚生労働省に蓄積されたベーチェット病患者の臨床データを用いて解析した。また、近年、小胞体アミノペプチダーゼ遺伝子の一種である *ERAP1* 遺伝子領域内の多型がトルコ人において本病と有意に相関することが報告されているため、日本人患者群を対象として *ERAP1* 遺伝子の多型解析を行い、*HLA-B\*51* および *HLA-A\*26* との遺伝子間相互作用を解析した。また、小胞体アミノペプチダーゼ遺伝子である *ERAP2* においても同様に調査した。

#### (1) ベーチェット病患者の臨床症状に対する *HLA-B\*51* の影響の評価

厚生労働省に臨床データが登録されている日本人ベーチェット病患者の中から、*HLA-B\*51* 保有の有無の情報が登録されて 3044 例の患者を選択し、本研究の対象とした。*HLA-B\*51* 保有の有無で層別化し、*HLA-B\*51* 陽性群と *HLA-B\*51* 陰性群の間で各臨床症状の出現率を比較した。その結果、*HLA-B\*51* 陽性患者群は、*HLA-B\*51* 陰性患者群に比べて、虹彩毛様体炎や網膜ぶどう膜炎といった眼症状の出現率が高く、一方、外陰部潰瘍および消化器病変の出現率が低かった。また、*HLA-A\*26* 陽性者も眼症状の出現リスクが高かった。口腔内アフタ性潰瘍、皮膚症状、関節炎、精巣上体炎、血管病変、中枢神経病変の出現率に関しては、*HLA-B\*51* 陽性群と陰性群の間で有意差は認められなかった。消化器病変は日本人患者群に多く、*HLA-B\*51* 陽性者が有意に少ないことから、ベーチェット病患者はいくつかの患者クラスターに分類されることが示唆された。今後、HLA 遺伝子解析により、ベーチェット病の臨床症状や病態の予測が可能になり、病態に応じた早期の治療に繋がることが期待される。

#### (2) ベーチェット病における HLA クラス I リスク因子と *ERAP1-ERAP2* 遺伝子領域の遺伝子間相互作用の検討

日本人ベーチェット病患者 611 例、健常者 737 例を対象として、*ERAP1-ERAP2* 遺伝子領域を網羅する 49 個の SNP の遺伝子型をもとに imputation 解析を行い、851 個の imputed SNP の遺伝子型情報を取得した。得られた SNP 多型と *HLA-B\*51* および *HLA-A\*26* 間の遺伝子間相互作用を検討した。発現量の解析は eQTL にて行った。その結果、*ERAP1-ERAP2* 領域に患者群と相関を示す SNP が複数認められた。SNP 数から補正して、現在、統計学的有意差検定を行っている。それらをもとに、*ERAP1* 遺伝子領域と *HLA-B\*51* 遺伝子および *ERAP2* 遺伝子領域と *HLA-B\*51* 遺伝子の遺伝子間相互作用を解析している。また、QTL 解析によりそれらの発現量を解析している。今後、新たな日本人集団および海外他人種集団を用いて追認試験も実施していく予定である。

光藤副査より以下の質問がなされた

1. *HLA-B\*51* の検索はどの段階で調査をしているのか.
2. *HLA-B\*51* 陽性で眼症状の出現が多い, 消化器症状・外陰部潰瘍の出現が少ないとあるが, このような違いには, 人種差などが関係しているのか.
3. ベーチェット病の診断を行うにあたって, *HLA-B\*51*, *HLA-A\*26* を測定することは役立つのか. *HLA* ステータスの診断における役割は診療ガイドラインに記載されているのか.
4. *ERAP1* のリスク SNP を認め, かつ, *HLA-B\*51* を認めれば, ベーチェット病の発症リスクが上昇すると解釈してよいのか. 現時点でベーチェット病と診断されていない方でも, *ERAP1* のリスク SNP, *HLA-B\*51* を認めた場合, 今後発症する可能性はでてくるのか.

以上の質問に対して以下の回答がなされた.

1. 各施設による違いはあるが, 基本的には疑い症例については, 早期の段階で, *HLA-B\*51* の有無を調査する方向である.
2. 海外に比べ, 日本人では眼症状が多いことが分かっている. また, 日本人では診断基準の違いで特殊型の症例が多い. 特殊型のなかには ICBG を満たさない症例も見受けられる. 人種間の違いには, 人種差などの遺伝要因や環境要因が複合的に関わっていると考えられる.
3. *HLA* ステータスを評価することは, ベーチェット病の診断の補助的な役割を持つ. 厚生労働省の診断基準には, 検査所見として, 必ずしも必須ではないが, *HLA-B\*51* や *HLA-A\*26* の有無について記載されている.
4. *ERAP1* のリスク SNP と *HLA-B\*51* の遺伝子間相互作用から, ベーチェット病の発症リスクは高くなると考えられる. 同様に, 現時点で診断されていなくても, 今後発症する可能性はあると考えられる.

水口副査より以下の質問がなされた

1. *ERAP1* と *ERAP2* の連鎖不平衡はどうなっているのか. *ERAP1* と *ERAP2* は別のリスクとしてとらえてよいのか.
2. 連鎖不平衡があるようであれば, 別々で分けて調査する意味はあるのか.
3. GWAS で得られた結果について統計学的な補正はしなくてよいのか.
4. *ERAP1*, *ERAP2* のバリエーションが入ることで, ベーチェット病の発生にどのように関わっているのか.
5. 今後, どのようにしてベーチェット病の新しい遺伝子を見つけていこうとしているのか.

以上の質問に対して以下の回答がなされた.

1. 現在, 調査中であるが, おそらく連鎖不平衡下にあることが予想される. *ERAP2* は *ERAP1* の補助的な役割を持っていると考えており, 互いに影響しあっていることが考えられる.

2. おそらく、*ERAP1*にプライマリーとなる多型があると予想しているが、*ERAP2*にプライマリーがある可能性もある。従って、連鎖不平衡下にあるとはいえ、どちらも調べる必要がある。
3. 解析の対象とした SNP が非常に多いので、ボンフェローニ法で補正すると、確かに関連解析の P 値の有意性は消失する。しかしながら、各 SNP 間で比較検討した上で、遺伝子間相互作用で認められる P 値は有意なままであると考えた。
4. *ERAP1* 変異において、ペプチドの C 末端と接触する部位に多型性があり、*ERAP1* に結合できるペプチドの長さや構造に影響を及ぼし、病原性となるペプチドを産生して、*HLA-B\*51* 分子と結合することが想定される。
5. 今後、Nを増やし、whole exome sequencing を実施し、レアバリエーションの発見に繋げていきたい。

宮城主査より以下の質問がなされた。

1. データベース以外の新たなサンプルを用い、調査をしたか。
2. *HLA-B\*51* の有無で臨床症状を評価した統計学的な調査は、こういった動機でされた調査なのか。診断や治療に役立てたいということなのか、病態の解明に役立てたいということなのか。
3. 今回の研究は一人で実施したものか。

以上の質問に対して以下の回答がなされた。

1. 横浜市大眼科学教室に蓄積された、サンプルを用いて、Imputation で得られたデータの再現性を、TaqMan アッセイにて評価した。
2. 疫学的な調査で知見を深めることで、その知見からクリニカルクエッションを導き、基礎研究の発想の一助とし、病態解明に繋げていきたいという思いから調査した。
3. 指導医の指導のもと、自分で実験と解析を実施した。

本学位論文研究は、厚生労働省に蓄積された、ベーチェット病患者のデータを元にベーチェット病患者の臨床症状に対する *HLA-B\*51* の影響の評価を実施した。また、ベーチェット病患者を対象に、*ERAP1-ERAP2* 領域、およびその近傍領域の遺伝子多型を高密度に解析している。本研究の成果は、ベーチェット病の発症や臨床症状の発生メカニズムの解明の一助になるとともに、ベーチェット病の遺伝子診断の基礎となり得る可能性を有する。したがって、本研究は学術的に高く評価できる研究であると考えられる。

以上より本研究は博士（医学）の学位に値するものと判定された。

## 学位審査の総括

本学視覚器病態学において、長年研究が継続され多数の業績が蓄積されている日本人ベーチェット病患者の免疫学的研究を発展させた研究である。厚生労働省に登録されている臨床データの解析結果で、*HLA-B\*51* 陽性患者群は、*HLA-B\*51* 陰性患者群に比べて、虹彩毛様体炎や網膜ぶどう膜炎といった眼症状の出現率が高く、*HLA-A\*26* 陽性者も眼症状の出現リスクが高かった一方、外陰部潰瘍および消化器病変の出現率が低いことを臨床研究の重要な知見として明らかにした。消化器病変は日本人患者群に多く、*HLA-B\*51* 陽性者が有意に少ないことから、ベーチェット病患者はいくつかの患者クラスターに分類されることが示唆され、ベーチェット病の臨床症状や病態の予測が可能になり、病態に応じた早期の治療に繋がることが期待される結果が得られた。

さらに、基礎的研究としてベーチェット病における HLA クラス I リスク因子と *ERAP1-ERAP2* 遺伝子領域の遺伝子間相互作用の検討について、自ら疾患遺伝子データベースおよび患者検体を用いた研究を実施している。*ERAP1-ERAP2* 遺伝子領域を網羅する 49 個の SNP の遺伝子型をもとに imputation 解析を行い、851 個の imputed SNP の遺伝子型情報を取得した。得られた SNP 多型と *HLA-B\*51* および *HLA-A\*26* 間の遺伝子間相互作用を検討し *ERAP1-ERAP2* 領域に患者群と相関を示す SNP が複数認められた。統計学的有意差検定それらをもとに、*ERAP1* 遺伝子領域と *HLA-B\*51* 遺伝子および *ERAP2* 遺伝子領域と *HLA-B\*51* 遺伝子の遺伝子間相互作用を解析し、さらなるベーチェット病の発生要因、病態と将来の新たな免疫学的治療開発に発展する可能性のある学術的価値の高い研究につながっていると総合的に評価した。

プレゼンテーション、副査と主査からの質問についても適切な説明がなされ、本人の研究への貢献も大きいことから、甲号学位相当の研究であると判断した。

2022 年 8 月 10 日

主査 宮城悦子（生殖生育病態医学 主任教授）