

学位論文の要旨

学位の種類	博 士	氏 名	黒田 光
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>サルコイドーシスに関連する遺伝的要因の検討</p> <p>共 著 者 名</p> <p>西條泰明、長谷部直幸</p> <p>未 公 表</p> <p>研 究 目 的</p> <p>サルコイドーシス(サ症)は、原因不明の多臓器性肉芽腫性疾患である。日本において有病率は10万対0.3～1.7と報告されるが地域差があり、特に本学近郊の富良野盆地での高発症(有病率 1992年10万対25.4)が報告されている。臨床経過は多彩であり、罹患臓器には人種・民族間の差異が存在する。日本人は眼病変・心病変合併が高率で、欧米では肺野病変での死亡率が高いのに対し、特に死因の47～78%を心病変が占め予後不良因子となっている。</p> <p>近年、疾患の発症や病状への関与が疑われる Single Nucleotide Polymorphism(SNP)解析が進められ、サ症では、肉芽腫形成の反応はTh1型免疫応答と考えられることからTh2型免疫の抑制も含め各種サイトカインでの解析が報告されている(論文1)。また、genome wide scanにより6p21-22領域の遺伝子の関連が示唆され(論文2)、ドイツの報告よりButyrophilin-like protein 2 (BTNL2) が有力な疾患感受性遺伝子と推測されている(論文3)。しかし、日本の病型は欧米とは異なり、日本人集団を対象としたBTNL2についての報告はなく、他のSNP結果も含め人種差を超えた遺伝的要因が存在するか否かは、検討が必要である。</p> <p>本研究では、日本人で変異型の頻度が高く、機能的な役割が報告されている5個のサイトカインとBTNL2のSNPについて症例対照研究を行い、サ症発症予測因子としての役割の解明を目的とした。さらに、重症化予測因子としての役割の解明のため、眼病変・心病変との関連の検討を行った。</p>			

材 料 ・ 方 法

1. 対象は2007年1月～2009年9月までに、旭川医科大学病院および関連病院でサ症の診断基準と診断の手引き(2006)にて本症の診断基準を満たす通院中の患者で承諾の得られた208名(うち男性52名)で、眼病変を有する患者は113名、心病変を有する患者は50名であった。心病変については、2006年の基準に加え、すでに1992年の基準に基づき診療継続中の患者も対象とした。また、当院外来や関連病院を高血圧等の慢性疾患で受診した患者や健診目的の受診者のうち、胸部レントゲン上でbilateral hilar lymphadenopathy(BHL)や間質陰影を認めず、12誘導心電図上で、房室ブロック・脚ブロック・ST-T異常・心室性期外収縮を認めない328名(内訳:健診214名(男性165名)、サ症以外の軽症慢性疾患通院患者114名(男性6名))を対照群とした。本研究は当院および研究参加病院の倫理委員会において承認を受け、同意承諾を得られた患者・健診受診者を対象とした。

2. 対象者より2ccの0.05M EDTA添加スピッツに静脈血を採取し、QIAGEN DNA精製キットにてDNAを精製抽出した。6つのSNP: IL10-819 C/T、IL10-592 A/C、IL6-572 C/G、TNF- α -857 C/T、TNF- α -1031T/C、BTNL2 G/A(dbSNP: rs2076530)を、Applied Biosystems StepOne[™]/StepOnePlus[™]リアルタイムPCRシステムにて、TaqMan[®] SNP Genotyping Assaysを用いて、解析した。TaqMan Genotyping master mix 5.0 μ L、40x assay mixture 0.25 μ L、DNA 1.0 μ Lに純水を加え、計10 μ Lとしてプレートに注入した。Polymerase chain reaction (PCR)増幅は、①50 $^{\circ}$ C/2分、95 $^{\circ}$ C/10分のincubationを45サイクル、②92 $^{\circ}$ C/15秒のdenaturation、③60 $^{\circ}$ C/1分のannealing/extensionの手順で行った。

3. オッズ比(OR)とそれらの95% confidence intervals(CI)は、ロジスティック回帰分析を用い、単変量解析を行った後、性・年齢調整解析を行った。解析は、Dr.SPSS II for Windowsを用い、 $P < 0.05$ を有意差ありと判定した。

成 績

1. BTNL2 G/A多型について、疾患群ではA alleleのhomozygoteにて、有意のオッズ比上昇(性、年齢調整)を認めた($p=0.008$ 、OR2.04、95%CI=1.21-3.46)。臓器別病変の有無による解析の結果、眼病変合併例(N=113、 $p < 0.001$ 、OR4.20、95%CI=1.90-9.26)、心病変合併例(N=50、 $p=0.012$ 、OR4.12、95%CI=1.37-12.46)では更にオッズ比が上昇した。

2. TNF-857 C/T多型では、全体解析では有意差を認めなかったが、心病変合併例において、T allele carrierで、有意のオッズ比の上昇を認め($p=0.020$ 、OR2.13、95%CI=1.13-4.04)、T alleleのhomozygoteでは、オッズ比は更に上昇した($p=0.006$ 、OR6.01、95%CI=1.66-21.80)。

考 案

BTNL2は、Tcell活性化に関与する補助シグナル伝達分子と考えられ、BTNL2 G/A多型については、2005年のドイツ人やアメリカ白人の報告同様全サルコイドーシス例と有意な関連を認め、多民族にて確認されたことから、サ症の有力な疾患感受性遺伝子であると予測された。また、日本人患者に特有の眼病変・心病変合併群で更にオッズ比の上昇を認め、重症予測化因子としての意義が推測された。TNF- α -857 C/T多型はTNF- α のプロモーター領域である-857において転写因子であるorganic cation transporter 1(OCT-1)が、Allele特異的結合様式を示し、T alleleでのTNF- α 発現亢進が予測されており、2002年にサ症全体群との有意な関連が得られたという欧州の報告、2007年にサ症全体群では関連を認めなかったが、再燃群・多臓器罹患群では関連を認めたとのトルコの報告がある。今回の我々の検討では、心病変合併サ症群で関連を認め、サ症の重症化予測因子と予測された。




結 論

BTNL2 G/A多型についてのA alleleのhomozygoteは、サ症の発症予測因子ならびに眼病変や心病変合併の重症化予測因子となる可能性が示唆された。さらに、TNF- α -857 C/T多型についても、T alleleの存在が、心病変合併の重症化予測因子となる可能性が示唆された。今後サ症の病型・予後や経過観察など臨床応用への端緒となるものと考えられた。

引 用 文 献

1. Grutters JC, Sato H, Pantelidis P, et al. Increased frequency of the uncommon tumor necrosis factor -857T allele in British and Dutch patients with sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165:1119-24.
2. Schurmann M, Reichel P, Muller-Myhsok B, Schlaak M, Muller-Quernheim J, Schwinger E. Results from a genome-wide search for predisposing genes in sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164:840-6.
3. Valentonyte R, Hampe J, Huse K, et al. Sarcoidosis is associated with a truncating splice site mutation in BTNL2. *Nat Genet.* 2005;37:357-64.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏名	黒田 光
<p>審査委員長 蒔田 芳男 </p> <p>審査委員 飯塚 一 </p> <p>審査委員 長谷部直幸 </p>			
<p>学位論文題目</p> <p>サルコイドーシスに関連する遺伝的要因の検討</p>			

本研究は、サルコイドーシスの好発地域として知られる富良野盆地を含む旭川近郊の患者と対象として、炎症関連サイトカインと T 細胞活性化シグナル分子における 6 SNP(single nucleotide polymorphism)s を用いた症例対照研究である。サルコイドーシスの肉芽腫形成に関与する functional SNP 解析から以下の知見が得られた。

①サルコイドーシスの発症因子 欧米での 4 報告以外では初めて、黄色民族である日本人において、BTNL2(rs2076530)G/A 多型での AA homotype での関連性について証明した。

②眼病変では、IL-10-819T/C 多型・IL-10-592A/C 多型において、それぞれ wildtype のホモタイプ保有でのオッズ比の上昇を認め、BTNL2(rs2076530)G/A 多型においては、AA homotype の保有にて、オッズ比が 4.20 と強い関連性を初めて証明した。

③心病変については、TNF- α -857C/T 多型では TT homotype でのオッズ比が 6.01 と有意な上昇を示し、BTNL2(rs2076530)G/A 多型においても、AA homotype でのオッズ比が 4.12 と有意な上昇を示した。

以上の知見は、日本に多い眼病変・心病変についての病型分類や、日本人の場合の予後規定因子となっている心病変の進行予測などへの応用を期待させるものである。今後、日本人におけるサ症の病型・予後予測や経過観察などの指標の候補 SNP として有望であると考えられた。

論文提出者は、症例対象研究のための必要な関連領域に関わる質問にも十分な知識と論理的な展開を背景に返答することができた。

以上の内容から、本審査委員会は本論文が医学博士の学位論文をして値するものと判定した。