



潰瘍大腸炎とHLA遺伝子 : 遺伝素因および憎悪因子としての検討

二見(大内), 佐智子

(Citation)

神戸大学医学部紀要, 60(2/3/4):157-166

(Issue Date)

2000-03

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00042541>



潰瘍大腸炎とHLA遺伝子：遺伝素因および増悪因子としての検討

二 見 - 大 内 佐智子

神戸大学医学部第二内科（指導 春日雅人 教授）

〒650-0017 神戸市中央区楠町7丁目5-2

TEL : 078-382-5861

FAX : 078-382-2080

（平成11年12月8日受付）

【要 約】

潰瘍性大腸炎（ulcerative colitis：以下UC）とHLAとの相関を、血清学的タイピング、DNAタイピングにより検討すると共に、UCと最も強い正相関を示すDRB1*1502対立遺伝子の有無で発症年齢、罹患範囲、重症度、ステロイド治療について比較検討した。

UCは対照に比して、血清学的タイピングでは、B52(49.2% vs 19.1% ; $p<0.0001$), DR15 (66.2% vs 32.4% ; $p<0.0001$) が高率に認められた。DNAタイピングでは、連鎖不均衡にあるDRB1*1502 (52.3% vs 16.9% ; $p<0.0001$), DQA1*0103 (53.8% vs 30.1% ; $p=0.0009$), DQB1*0601 (58.5% vs 28.7% ; $p<0.0001$), DPB1*0901 (44.6% vs 16.9% ; $p<0.0001$) がそれぞれ高率に認められた。

DRB1*1502対立遺伝子の有無による臨床型の比較では発症年齢、罹患範囲、重症度に関しては有意な差は見られなかったが、全てのDRB1*1502陽性例ではステロイド投与量が年平均3g以上または総投与量が5gを超えており、年平均投与量は 2.4 ± 3.78 gで、陰性例の 0.48 ± 0.50 gに比して多かった。DRB1*1501とDRB1*1502を区別するDR β 鎖86位はHLA分子の構造上 α 鎖と β 鎖の境界に位置し、抗原ペプチドとの結合や立体構造上の安定性に重要な働きをしている部位と考えられ、DRB1*1502はUCの疾患感受性およびその増悪に関与していると考えられた。

【緒 言】

潰瘍性大腸炎（ulcerative colitis：以下UC）は慢性炎症性腸疾患であるが原因はいまだ明らかにされていない。家族集積性が報告⁽¹⁻³⁾されていることから遺伝素因として関与が、一方抗大腸抗体などの自己抗体の報告⁽⁴⁾から免疫異常の関与が示唆されているが、

HLAは両者の関与をあわせもっておりUCの発症、病態を考える上で重要である。しかし、インスリン依存型糖尿病では民族を超えた普遍的なHLAタイプが見い出されている^(5, 6)が、UCでは日本人でB52, DR2^(7, 8)及びイスラエル人でB35⁽⁹⁾の正相関が報告されているが、より均一な集団でない欧米では有意な相関はみられていない。

近年HLAの検査法が改良され、さらに詳細検索が可能になった一方、UCは罹患範囲や重症度などによりいくつかの臨床型に分けられるので、詳細な臨床背景を念頭にHLAの血清学的タイピングにDNAタイピングを加えてUCとHLAとの関連を検討した。

【対象および方法】

神戸大学医学部付属病院及びその関連施設において厚生省の潰瘍性大腸炎診断基準にレントゲンの、内視鏡的、病理学的、臨床的に合致した65例と性、年齢に有意差を認めない非血縁健康日本人136例を対象とした。

1) 血清学的タイピング

HLA-A, B, C locusの解析はNIH標準検査法に、DR, DQ locusの解析は国際組織適合性会議の方法に従った。

2) DNAタイピング

末梢血からリンパ球を分離し、高分子DNAを抽出した（フェノール抽出）（Table 1）後、それぞれに特異的なプライマー条件でPCRを行い、制限酵素で切断後、12%ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行い、切断パターンにより allele を決定した（PCR-RFLP法）（Table 2）。例えばDR2については、DR β 鎖の多様部位263bpをはさむプライマーでPCRを行い、制限酵素Hph1, Fok1, Cfr131で切断し、DRB1*1501, 1502 (DR15), 1601, 1602 (DR16)

Key Words : 潰瘍性大腸炎, HLA, 病因

Table.1 PCR primers for amplification and restriction endonucleases for genotyping of DRB1 alleles

Sequences (5' to 3')				Den.	Ann.	Ext.	Restriction Endonuclease
				temperature(°C)			
DR1	5'primer	GGTTGCTGGAAAGATGCATCT	(206bp)	97	57	72	AvaII, PstI
DR2	5'primer	TTCTGTGGCAGCCTAAGAGG	(263bp)	96	58	72	FokI, Cfr13I, HphI
DR3,5,6,8	5'primer	ACGTTTCTTGGAGTACTCTACG	(265bp)	97	58	72	AvaII, FokI, KpnI, HaeII, cfr13I, SfaNI, SacII, BsaII, ApaI, HphI, RsaI
DR4	5'primer	GTTCTTGGAGCAGGTAAAC	(263bp)	96	55	72	SacII, AvaII, HinfI, HaeII, MnlI, HphI
3'primer (common for DRB1)		CCGCTGCACTGTGAAGCTCT					

Den.; Denature, Ann.; Annealing, Ext.; Extension

Table 2. PCR primers for amplification and restriction endonucleases for genotyping of DQA, DQB, DPB alleles

	Sequences (5' to 3')	Den.	Ann.	Ext.	Restriction Endonuclease
DQA	GH 26 GTGCTGCAGGTGTAACTTGTACCAG	96	62	72 (°C)	Hae III, Dde I, ScrF I,
	GH 27 CACGGATCCGGTAGCAGCGGTAGAGTTG	60	60	120 (sec)	Fok I, Rsa I
DQB	GH 28 CTCGGATCCGCATGTGCTACTTCACCAACG	96	62	72 (°C)	Hea III, Fok I, Sau 3 A I,
	GH 29 GAGCTGCAGGTAGTTGTGTCTGCACAC	60	60	120 (sec)	Rsa I, Hha I
DPB	PB 101 GTGGGATCCTCCGCAGAGAATTAC	96	62	72 (°C)	Apa I, Sac I, BstU I,
	PB 201 CACCTGCAGTCACTCACCTCGGCGCTG	60	60	120 (sec)	Fok I, Rsa I

に細分化した (Table 1)。同様にDQ, DPB1についてもPCR-RFLP法にてタイピングを行った⁽¹⁰⁾ (Table 2)。

3) DRβ鎖コドン86位

DR15はDRB1*1501とDRB1*1502に分けられ、両者のアミノ酸配列の差はDRβ鎖コドン86位のアミノ酸ひとつであり、DRB1*1501はValをDRB1*DRB1*1502はGlyを有している。DR鎖のコドン86位にGlyを有している遺伝子頻度を検討した。

4) 臨床パラメーターの比較

発症年齢、罹患範囲、重症度、ステロイド治療の有無について特有のHLAタイピング間での比較を行った。2年以上経過観察し得た26例について総ステロイド使用量、年平均ステロイド使用量とHLAタイピングとを比較した。

5) 統計処理

χ^2 検定、相対危険率で行い、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

【成 績】

1) 血清学的タイピング (Table 3)

UCでは対照に比してB52 (49.2% vs 19.1% : $p <$

0.0001), DR15 (66.2% vs 32.4%, $p < 0.0001$) が高率に認められた。

2) DNAタイピング (Table 4-8)

UCでは対照に比してDRB1*1502 (52.3% vs 16.9% : $p < 0.0001$), (Table 4), DQA1*0103 (53.8% vs 30.1% : $p = 0.0009$), DQB1*0601 (58.5% vs 28.7% : $p < 0.0001$) (Table 5), DPB1*0901 (44.6% vs 16.9% : $p < 0.0001$) が高率 (Table 6), またDRB1*0101 (4.6% vs 16.9% : $p < 0.015$), DQA1*0101 (6.2% vs 35.3% : $p < 0.0001$) が低率であった。特にDR2に占める亜型のDRB1*1502の割合はUCでは79%で対照の53%に比して有意に高かった ($p < 0.01$)。またDRB1*1502を有さないUC例ではDRB1*0901が64.5%で最も高頻度であり対照 (27.4%) に比して有意に高率であった ($p < 0.0001$)。またUCの83%でDRB1*1502もしくはDRB1*0901を有していた (Table 7)。

一方、HLA-A24-B52-DRB1*1502-DQA1*0103-DQB1*0601-DPB1*0901は連鎖不均衡にあるが、これらのハプロタイプおよび構成する各locus単独とUCとの関連を比較すると、DRB1*1502が最も相対危険率が高くUCに関連していると考えられた (Table 8)。

Table 3. Frequencies of HLA antigens in patients with ulcerative colitis and healthy controls

HLA antigen	UC(n=65)		Controls(n=136)		R.R.	Statistical Analysis	
	NO. of case	P.F.(%)	NO. of case	P.F.(%)		χ^2	P Value
A 2	20	30.8	61	44.9	0.70	3.34	
A 24	46	70.8	85	62.5	1.15	1.69	
B 7	3	4.6	20	14.7	0.32	4.29	
B 44	6	9.2	20	14.7	0.64	1.09	
B 46	3	4.6	16	11.8	0.40	2.53	
B 52	32	49.2	26	19.1	2.62	20.16	< 0.0001 ↑
Cw 3	21	32.3	26	19.1	1.72	4.54	
Cw 4	8	12.3	8	5.9	2.12	2.59	
Cw 7	8	12.3	30	22.1	0.57	2.58	
Cw 9	3	4.6	19	14.0	0.34	3.83	
Cw 10	2	3.1	12	8.8	0.36	2.17	
DR 1	3	4.6	23	16.9	0.28	5.75	
DR 4	21	32.3	64	47.1	0.66	4.46	
DR 8	8	12.3	33	24.3	0.51	3.70	
DR 9	23	35.4	36	26.5	1.35	1.88	
DR 13	5	7.7	22	16.2	0.48	2.61	
DR 14	0	0.0	23	16.9	0.00	3.54	
DR 15	43	66.2	44	32.4	2.07	21.49	< 0.0001 ↑

Defined by serological typing, only antigens with chi squares above 1.00

P.F ; Phenotype frequency R.R. ; Relative risk (↑); positive association (↓); negative association

Table 4. Frequencies of HLA-DR loci alleles in patients with ulcerative colitis and healthy controls

HLA allele	UC(N=65)		Controls(N=136)		Statistical analysis	
	Cases(N)	AF(%)	Cases(N)	AF(%)	RR	P
DRB1*0101	3	4.6	23	16.9	0.27	0.0151
0102	0	0	0	0	0	
0103	0	0	0	0	0	
1501	9	13.8	20	14.7	0.026	0.8711
1502	34	52.3	23	16.9	3.09	<0.0001
1601	0	0	0	0	0	
1602	0	0	1	0.07	0	
0301	0	0	0	0	0	
0302	0	0	0	0	0	
0401	0	0	2	1.4	0	
0402	0	0	0	0	0	
0403	0	0	11	8.09	0	
0404	0	0	0	0	0	
0405	18	27.7	42	30.88	0.90	
0406	3	4.6	4	2.9	1.59	
0407	0	0	2	1.5	0	
0408	0	0	0	0	0	
0409	0	0	0	0	0	
0410	0	0	3	2.2	0	
0411	0	0	0	0	0	
1101	2	3.1	8	5.88	0.53	
1102	0	0	0	0	0	
1103	0	0	0	0	0	
1104	0	0	0	0	0	
1201	6	9.2	6	4.4	2.09	
1202	0	0	4	2.9	0	
1301	0	0	0	0	0	
1302	5	7.7	22	16.17	0.48	
1303	0	0	0	0	0	
1304	0	0	0	0	0	
1305	0	0	0	0	0	
1401	1	1.5	11	8.1	0.19	
1402	1	1.5	0	0	0	
1403	1	1.5	2	1.5	1.00	
1404	0	0	0	0	0	
1405	0	0	9	6.6	0	
1406	0	0	0	0	0	

Table 5. Frequencies of HLA-DQ loci alleles in patients with ulcerative colitis and healthy controls

HLA allele	UC(N=65)		Controls(N=136)		Statistical analysis	
	Cases(N)	AF(%)	Cases(N)	AF(%)	RR	P
DQA1*0101	4	6.2	48	35.3	0.180	<0.0001
0102	12	18.5	36	26.5	0.700	
0103	35	53.8	41	30.1	1.790	
0201	1	1.5	0	0.0	0.000	
0301	41	63.0	105	77.2	0.820	
0401	3	4.6	14	10.3	1.832	
0501	11	16.9	18	13.2	1.280	
0601	1	1.5	4	2.9	0.520	0.0678
DQB1*0103	1	1.5	0	0.0	0.000	
0301	7	10.8	29	21.3	0.510	
0302	4	6.2	25	18.4	0.340	
0303	23	35.4	36	26.5	1.340	
0401	16	24.6	43	31.6	0.780	
0402	3	4.6	8	5.9	0.780	
0501	3	4.6	28	20.6	0.220	
0502	0	0.0	10	7.4	0.000	
0503	1	1.5	7	5.1	0.290	
0601	38	58.5	39	28.7	2.040	
0602	8	12.3	20	14.7	0.840	
0604	5	7.7	21	15.4	0.500	

Table 6. Frequencies of HLA-DP loci alleles in patients with ulcerative colitis and healthy controls

HLA allele	UC(N=65)		Controls(N=136)		Statistical analysis	
	Cases(N)	AF(%)	Cases(N)	AF(%)	RR	P
DPB1*0201	15	23.1	54	39.70	0.580	0.0027
0202	2	3.1	10	7.35	0.420	
0301	4	6.2	13	9.56	0.650	
0302	0	0.0	3	2.20	0.000	
0401	3	4.6	11	8.08	0.570	
0402	13	0.2	37	27.20	0.007	
0501	41	63.1	112	82.35	0.770	
0601	1	1.5	1	0.70	2.150	
0901	29	44.6	23	16.90	2.640	
1301	1	1.5	1	0.70	2.150	
1302	0	0.0	1	0.70	0.000	0.0678
1401	1	1.5	2	1.50	1.000	

Table 7. Frequencies of HLA-class II alleles in DRB1*1502 negative patients with in ulcerative colitis and healthy controls

HLA allele	UC(N=31)		Controls(N=113)		Statistical analysis	
	Cases(N)	AF(%)	Cases(N)	AF(%)	RR	P
DRB1*0901	20	64.5	31	27.4	2.35	<0.0001
DQA1*0101	1	3.20	43	38.5	0.08	0.0002
DPB1*0501	20	64.5	98	86.7	0.74	0.0040

3) DRβ鎖コドン86位

意に高率 ($p < 0.000005$) であった (Figure 1)。

DRB1遺伝子全体で86位に両対立遺伝子ともGlyを有するUC患者は70.1%で対照 (53.7%) に比べて有

Table 8. Haplotypic frequencies of HLA-Class II alleles in patients with ulcerative colitis and healthy controls

HLA allele	UC (N=65)		Controls (N=136)		Statistical analysis	
	Case (N)	AF (%)	Case (N)	AF (%)	RR	P
DRB1*1502-DQA1*0103						
-DQB1*0601-DPB1*0901	33	50.8	31	22.8	2.23	0.0655
DRB1*1502-DQA1*0103	25	38.4	23	16.9	2.27	0.0008
-DQB1*0601						
A24	46	70.8	85	62.5	1.15	NS
B52	32	49.2	26	19.1	2.62	<0.0001
DR15	43	66.2	44	32.4	2.07	<0.0001
DRB1*1502	34	52.3	23	16.9	3.09	<0.0001
DQA1*0103	35	53.8	41	30.1	1.79	0.0009
DQB1*0601	38	58.5	39	28.7	2.04	<0.0001
DPB1*0901	29	44.6	23	16.9	2.64	<0.0001

Figure 1. Amino acid sequences of HLA-DR β chain. DRB1 gene includes most polymorphic region; three variable region. DRB1*1502 has only one amino acid difference from 1501 at position 86 of the HLA-DR β chain.

D R B		10	20	30	40	50	60	70	80	90
DRB1*0101	DR1 Dw1	RFLVQLKFECHFFNGT	ERVLLERCITNQEESV	RFDSDVGEYRAVTE	LGRPD	AEYWN	SQKDLLE	GRRAAYDTY	CRHNYG	VGESFTYQRR
DRB1*0102	Dw20	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DRB1*0103	DR2 Dw1	-----P-R-----	-----F-D-YF-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----
DRB1*1501	Dw12	-----P-R-----	-----F-D-YF-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----
DRB1*1502	Dw21	-----P-R-----	-----F-D-YF-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----
DRB1*1601	Dw22	-----P-R-----	-----F-D-YF-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----
DRB1*1602	DR3 (DRw17)	-----EYSTS-----	-----Y-D-YFH-----	-----N-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----
DRB1*0301	(DRw18)	-----EYSTS-----	-----F-----YFH-----	-----N-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----
DRB1*0302	DR4 Dw4	-----E-V-H-----	-----F-D-YF-H-----	-----Y-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----
DRB1*0401	Dw10	-----E-V-H-----	-----F-D-YF-H-----	-----Y-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----
DRB1*0402	Dw13	-----E-V-H-----	-----F-D-YF-H-----	-----Y-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----
DRB1*0403	Dw14	-----E-V-H-----	-----F-D-YF-H-----	-----Y-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----
DRB1*0404	Dw15	-----E-V-H-----	-----F-D-YF-H-----	-----Y-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----
DRB1*0405	DK72	-----E-V-H-----	-----F-D-YF-H-----	-----Y-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----
DRB1*0406	Dw13	-----E-V-H-----	-----F-D-YF-H-----	-----Y-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----
DRB1*0407	Dw14	-----E-V-H-----	-----F-D-YF-H-----	-----Y-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----
DRB1*0408	DR5 (DRw11)	-----EYSTS-----	-----F-D-YF-----	-----Y-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----
DRB1*1101	(DRw11)	-----EYSTS-----	-----F-D-YF-----	-----Y-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----
DRB1*1102	(DRw11)	-----EYSTS-----	-----F-D-YF-----	-----Y-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----
DRB1*1103	(DRw11)	-----EYSTS-----	-----F-D-YF-----	-----Y-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----
DRB1*1104	(DRw11)	-----EYSTS-----	-----F-D-YF-----	-----Y-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----
DRB1*1201	(DRw12)	-----EYSTG-Y-----	-----HFH-----	-----LL-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----
DRB1*1301	DR6 (DRw13-Dw18)	-----EYSTS-----	-----F-D-YFH-----	-----N-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----
DRB1*1302	(DRw13-Dw19)	-----EYSTS-----	-----F-D-YFH-----	-----N-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----
DRB1*1303	(DRw13-DHAG)	-----EYSTS-----	-----F-D-YF-----	-----Y-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----
DRB1*1401	(DRw14-Dw9)	-----EYSTS-----	-----F-D-YFH-----	-----N-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----
DRB1*1402	(DRw14-Dw16)	-----EYSTS-----	-----F-D-YFH-----	-----N-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----
DRB1*1403	(DRw14 new)	-----EYSTS-Q-----	-----F-D-YFH-----	-----N-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----
DRB1*0701	DR7 (JX6)	-----EYSTS-----	-----F-D-YFH-----	-----N-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----
DRB1*0702	Dw17	-----G-YK-----	-----QF-----	-----LF-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----
DRB1*0801	DB1	-----G-YK-----	-----QF-----	-----LF-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----
DRB1*0802	DRw8 Dw8.1	-----EYSTG-Y-----	-----F-D-YF-----	-----Y-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----
DRB1*0803	Dw8.2	-----EYSTG-Y-----	-----F-D-YF-----	-----Y-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----
DRB1*0901	Dw8.3	-----EYSTG-Y-----	-----F-D-YF-----	-----Y-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----
DRB1*1001	DR9	-----X-D-----	-----Y-H-G-----	-----N-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----
DRB1*1002	DR10	-----EEV-----	-----RVE-----	-----YA-Y-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----
DRB3*0101	DRw52a	-----ELR-S-----	-----Y-D-YFH-----	-----FL-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----
DRB3*0201	b	-----EL-S-----	-----F-HFH-----	-----YA-----	-----R-----	-----R-----	-----R-----	-----R-----	-----R-----	-----R-----
DRB3*0202	c	-----EL-S-----	-----F-HFH-----	-----YA-----	-----R-----	-----R-----	-----R-----	-----R-----	-----R-----	-----R-----
DRB3*0301	c	-----EL-S-----	-----F-YFH-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----
DRB4*0101	DRw53	-----E-A-C-----	-----L-----	-----VN-I-Y-----	-----YA-VN-L-----	-----Q-----	-----R-----	-----E-----	-----Y-----	-----V-----
DRB5*0101	DR2 Dw2	-----Q-D-Y-----	-----F-H-D-----	-----DL-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----
DRB5*0102	Dw12	-----Q-D-Y-----	-----F-H-G-----	-----N-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----
DRB5*0201	Dw21	-----C-Q-D-Y-----	-----F-H-G-----	-----N-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----
DRB5*0202	Dw22	-----C-Q-D-Y-----	-----F-H-G-----	-----N-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----	-----F-----

Table 9. Relationship between HLA-DR2 subtypes and clinical types

	number(percentage) of DRB1*1502 positive patients (n=29)	number(percentage) of DRB1*1502 negative patients (n=30)
Onset		
age<30	16 (55.2%)	12 (40.0%)
age>30	13 (44.8%)	18 (60.0%)
Extent		
rectum	2 (6.9%)	2 (6.7%)
left side colon	7 (24.1%)	8 (26.7%)
total colon	20 (69.0%)	20 (66.7%)
Severity		
severe	9 (31.0%)	7 (23.3%)
Treatment		
corticosteroid	24 (72.7%)	15 (46.9%)*

* p<0.05

Table 10. Relationship between HLA-DR2 subtypes and dose of taking steroid

	DRB1*1502 positive (n=17)	DRB1*1502 negative (n=9)
Annual Total dose of required prednisolone	2.40 ± 3.78 g/year	0.48 ± 0.50 g/year
Number of patients medicated with more than 3g every year or more than 5g in total	8 (47.0%)	0 (0%)

4) 臨床型との比較 (Table 9-10)

DRB1*1502を有するものと有さないもの間には、発症年齢、罹患範囲、重症度に有意な差は見られなかったが、治療については、DRB1*1502を有するもののほうが、ステロイド治療を必要としていた (Table 9)。2年以上経過観察ができた26例についてステロイド投与量を比較したところ、DRB1*1502陽性者は17例、陰性者は9例であり、陽性者は全員年平均3g以上または総ステロイド投与量が5gを超えていた (Table 10)。この中には慢性持続型で下血が続くために外科的治療を要したもので、7年間に6回以上再燃を繰り返した重症例などが含まれており、また1年あたりの平均使用ステロイド量はDRB1*1502陽性例では 2.4 ± 3.78 gと、陰性例の 0.48 ± 0.50 gに比して多かった。

【考 察】

潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis:UC) の原因は

不明であるが、何らかの抗原と結合したHLA分子を細胞が認識することから免疫応答が始まり、結果として大腸粘膜の障害が引き起こされることから、特定のHLAタイプは大腸粘膜における免疫反応を考える上で重要である。現在まで、日本人でB52, DR2^(7, 8)が、またイスラエル人でB35⁽⁹⁾がUCと正相関することが報告されているが、その後DR2はDR15と16に細分化され、日本人ではDR16はまれなので、DR15がUCに正相関している今回の成績は、B52が正相関していることともに従来の報告と一致している。血清学的にA24-B52-DR2は連鎖不均衡の状態にあり、B52とDR15のいずれが一義的にUCに関連しているかは不明である。杉村ら⁽⁸⁾は日本人UCでは対照に比してB52がDR2より有意に高率に認められたこと、またB52を持たない患者群でB13とB44に増加が認められ、これらはアミノ酸配列は機能的相同性を示していることから、B抗原そのものがUC疾患感受性に関与していると推測している。しかしこの成績と異なり、今回の我々の成績ではDR15がB52より高率に認められた

こと、さらにDR遺伝子そのものが高度な多型性を持ち、現在まで多くの疾患感受性に関連している報告が多くみられることから、DR・DQ・DP遺伝子、即ち、class II 遺伝子の解析を中心に行った。血清学的タイピングで、今回UCではDR2の中でDR15の割合は100%と対照の48%に比して有意に高い ($p<0.000005$) こと、さらにDNAタイピングで、対照では DR15は DRB1*1501とDRB1*1502が約半数ずつであるが、UCではDR15のうちDRB1*1502が約85%と高率である ($p<0.000005$) ことから、DRB1*1501とDRB1*1502の差がUCの疾患感受性に関連している可能性が考えられる。一方、ハプロタイプとして血清学的タイピングではHLA-A24-B52-DR15が、DNAタイピングでは、DRB1*1502-DQA1*0103-DQB1*0601-DPB1*0901が連鎖不均衡にあるため、各々単独でも正相関するが、中でもDRB1*1502が最も強く相関した (Table 8) ことからDRB1*1502の重要性が示唆される成績であった。遺伝子レベルでのDRB1*1501とDRB1*1502の差はDR β 鎖コドン86位のアミノ酸ひとつのみでDRB1*1501はValをDRB1*1502はGlyを有している。DR β 鎖86位はHLA分子の構造上 α 鎖の境界に位置し、抗原ペプチドとの結合や立体構造上の安定性に重要な働きをしていると考えられ、DRB1遺伝子全体で86位のアミノ酸を検討しても両対立遺伝子ともにGlyを有する割合はUCでは66%と対照(51%)に比して有意に高率であった (Table 10)。

このことは、UCの疾患感受性への関与のみならず鑑別診断が困難な場合に有用な補助診断となりうると考えられた^(11, 12)。一方、DQ遺伝子は糖尿病で疾患感受性および抵抗性に関連している可能性が指摘されていたが^(5, 6)、UCにおいてはDRB1*1502に比して単独での強い相関は見られず、DRB1*1502が一義的でDQ遺伝子は連鎖不均衡の影響を受けているものと考えられた。DP遺伝子は他の遺伝子から離れており、最も連鎖不均衡の影響を受けにくいことが期待されたが、やはり強い相関は見られなかった。糖尿病でも有意な相関はみられなかったとされている⁽¹³⁾。UCは、若年発症と壮年発症の二峰性を示したり、直腸のみに限局するタイプや全結腸に病変が及ぶタイプが存在することから必ずしも均一ではないと考えられる。そこでUC例においてDRB1*1502の有無と、発症年齢、罹患範囲、重症度を比較したが有意な差は認められなかったが、ステロイド投与量では、DRB1*1502を有する例では有さない例に比較して投与量が多く、より重症例が多いと考えられた。この成績は、HLAが遺伝子素因のみならず増悪因子の指標となる可能性も示唆しており臨床的には非常に重要であり、さらに検討

を続ける必要があると考えている。HLAは民族差があることが知られており、他民族との比較は重要である。Roussomoustakases ら⁽¹⁴⁾は DRB1*103が正相関し、全結腸型や腸管外合併症をもつものと関連があると報告している。DRB1*103は日本人にはみられないタイプで、86位にあるアミノ酸もDRB1*1502にあるvalineでなくglycineであった。また欧米で新しい遺伝素因として注目された ANCA (antineutrophil cytoplasmic antibodies)⁽¹⁵⁾は、DRB1*1502との相関が報告されたが⁽¹⁶⁾、後の追試で否定されている⁽¹⁷⁾。ただしDR3DQ2TNF2ハプロタイプとの正相関があるとされている⁽¹⁸⁾。欧米ではHLA-DR2とUCとの関連については否定的であったが、最近肯定するような報告も散見される。Bouma G ら⁽¹⁹⁾はドイツ人UC患者でDRB1*15が高率に認められ、とりわけ全結腸型が多かったと報告している。MadridではDRB1*1501の正相関とDRB1*1601の負の相関が見られた⁽¹⁶⁾。一方Heresbach D ら⁽²⁰⁾はHLA-DR2はUC患者に有意に多く見られなかったが、HLA-DR2陽性者と陰性者では陽性者の方が結腸切除術を必要とした割合が多く、HLA-DR2が予後に関連していると報告している。HLA分子はその構造が詳細に解明されてきている^(21, 22)。多変部位はHLA分子の抗原結合部位のグロブ状の部位に一列に並んでおり、DRB1*1501とDRB1*1502を区別する86位はその辺縁に位置しており、病態に影響を与えている可能性が示唆された。実際86位のアミノ酸を変えることによって蛋白の結合性が異なるという報告も散見される⁽²³⁻²⁶⁾。Jerry H.B.⁽²²⁾らはclass1の抗原結合部位がポケット状になっているのに対し、class2では少なくとも15個からなる長いアミノ酸配列で認識していると推測している。糖尿病では多民族で有意な正相関が証明されたDRB 71LysはDQB 57Asp, DQA52Argよりも重要な危険因子となりうると報告されている⁽²⁷⁾。DRのAla76はDRB1*1501とDRB1*1502しかもたないアミノ酸であることも考え合わせると74-86を含む長い配列が抗原結合に関連していることが予測される。以上よりUCに何らかの強い関連があるHLA遺伝子はDRB1*1502であり、UCの疾患感受性に関与するものは少なくともHLA-DRB1*1502に関連するものであり、民族差を超え普遍的な病態に関連する指標として検討を続けてゆくことがのぞまれる。

【謝 辞】

稿を終えるに際し、本研究の御指導を頂きました神戸大学医学部第2内科春日雅人教授に深謝致します。

また終始御指導頂きました(現)神戸大学医学部付属病院光学医療診療部 青山伸郎教授、兵庫県血液センター能勢義介課長に御礼申し上げます。本研究の内容は、第94回アメリカ消化器病学会1993年(ボストン)⁽²⁸⁾、同第95回1994年(ニューオーリンズ)⁽²⁹⁾で発表し、その一部は文献^(11, 30)で報告した。

【文 献】

1. 宇都宮利善 潰瘍性大腸炎 (idiopathic proctocolitis) の疫学的研究 (第12報) 家族内発生し腸管外合併症について 厚生省難治性炎症性腸管障害調査研究班 昭和61年度業績集 : 46-49, 1987.
2. Farmer, R.G., Michener, W.M., Mortimer, E.A.: Studies of family history among patients with inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol* 9 : 271-278, 1980.
3. Robinson, W.W., Bentif, P.S., Kelsey, J.R.: Observations on 261 consecutive patients with inflammatory bowel disease seen in the southwest United States. *Dig Dis Sci* 25 : 198-204, 1980.
4. Broberger, O., Perlmann, P.: Autoantibodies in human ulcerative colitis. *J Exp Med* 110 : 675, 1959.
5. Todd, J.A., Mihoic, C., Fletcher, J., Jenkins, D., Bradwell, A.R., Barnett, A.H.: Identification of susceptibility loci for insulin dependent diabetes mellitus by transracial gene mapping. *Nature* 338 : 587-589, 1989.
6. Khali, J.I., Dauriol, L., Gobe, T.M., Morin, L., Lepage, V., Descamps, I., Patk, M.S., Dego, S.L., Galibert, F., Hors, J.: A combination of HLA-DOB Asp57-negative and HLA-DQA Arg 52 confers susceptibility to insulin dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 85 : 1315-1319, 1990.
7. Asakura, H., Tsuchiya, M., Aiso, S., Watanabe, M., Kobayashi, K., Hibi, T., Ando, K., Tabata, H., Sekiguchi, S.: Association of the human lymphocyte-DR2 antigen with Japanese ulcerative colitis. *Gastroenterology* 82 : 413-418, 1982.
8. Sugimura, K., Asakura, H., Mizuki, N., Inoue, M., Hibi, T., Yagita, A., Tsuji, K., Inok, H.: Analysis of genes within the HLA region affecting susceptibility to ulcerative colitis. *Human Immunology* 36 : 112-118, 1993.
9. Delpre, G., Kadish, U., Gazit, E., Joshua, H., Zamir, R.: HLA antigens in ulcerative colitis and Crohns disease in Israel. *Gastroenterology* 78 : 1452, 1457, 1980.
10. Ota, M., Seki, T., Tsuji, T., Inoko, H.: HLA-DRB1 genotyping by modified PCR-RFLP method combined with group-specific primers. *Tissue Antigen* 39 : 187-202, 1992.
11. Futami, S., Aoyama, N., Honsako, Y., Tamura, T., Morimoto, S., Nakajima, T., Ohmoto, A., Okano, H., Miyamoto, M., Inaba, H., Naruse, T., Nose, Y., Kasuga, M.: HLA-DRB1*1502 allele, subtype of DR15, IS associated with susceptibility to ulcerative colitis and its progression. *Dig. Dis. Sci.* 40 : 814-818, 1995.
12. Matsuda, H., Nakamura, Y., Tanaka, T., Hayakawa, S.: Distinct Relationship between HLA-DR Genes and Intractability of Ulcerative Colitis. *Am J Gastroenterol* 89 : 1957-1962, 1994.
13. Lie, B.A., Akselsen, H.E., Joner, G., Dahl Jorgensen, K., Ronningen, K.S., Thorsby, E., Undlien, D.E.: HLA associations in insulin dependent diabetes mellitus independent association to particular genes. *Hum Immunol.* 55 : 170-175, 1997.
14. Roussomoustakaki, M., Satsangi, J., Welsh, K., Louis, E., Fanning, G., Targan S., Landers, C., Jewell, D.P.: Generic Markers May Predict Disease Behavior in Patients With Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* 112 : 1845-1853, 1997.
15. Asakura, H., Sugimura, K.: HLA, Antineutrophil Cytoplasmic Antibody, and Heterogeneity in Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* 108 : 597-598, 1995.
16. Yang, H., Rotter, J. I., Toyoda, H., Landers, C., Tyman, D., Mc Elree, C.K., Targan, S.R.: Ulcerative colitis: a genetically heterogeneous disorder defined by genetic (HLA class II) and subclinical markers. *J Clin Invest* 92 : 1080-1084, 1993.

17. Duerr, R.H. Neigut, D.A.; *Gastroenterology* 108 : 423-4274, 1995.
18. Satsangi, J., Landers, C., Welsh, K. Koss, K., Targan, S., Jewell, D.P.: The presence of anti-neutrophil antibodies reflects clinical and genetic heterogeneity within inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 4 : 18-26, 1998.
19. Bouma, G., Oudkerk Pool, M., Crusius, J.B., Schreuder, G.M., Hellemans, H.P., Meijer, B.U., Kostense, P.J., Giphart, M.J., Meuwissen, S.G., Pena, A.S.: Evidence for genetic heterogeneity in inflammatory bowel disease (IBD): HLA genes in the predisposition to suffer from ulcerative colitis (UC) and Crohns disease (CD). *Clin Exp Immuno.* 109 : 175-179, 1997.
20. De La Concha, E.G., Fernavdez Arquero. M., Santa Cruz, S., Lopez Nava, G., Figueredo, M.A., Diaz Rubio, M., Garcia Paredes. J.: Positive and negative associations of distinct HLA-DR2 subtypes with ulcerative colitis (UC). *Clin Exp Immunol.* 108 : 392-395, 1997.
21. Heresbach, D., Alizadeh, M., Reumaux, D., Colombel, J.F., Delamaire, M., Danze, P.M., Gosselin, M., Genetet, B., Bretagne, J.F., Semana, G.: Are HLA-DR or TAP genes genetic markers of severity in ulcerative colitis? *J Autoimmun.* 9 : 777-784, 1996.
22. Brown, J.H., Jardetzky, T.S., Gorga, J.C., Stern, L.J., Urbarn, R.G., Strominger, J. L., Wiley, D.L.: Three-dimentional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364 : 33-39, 1993.
23. Debra, K. Newton-Nash, David, D. Eckels.: Differential Effect of Polymorphism at HLA-DR1 b-Chain Positions 85 and 86 Binding and Recognition of DR1-Restricted Antigenic Peptides. *The Journal of Immunology* 150 : 1813-1821, 1993.
24. Krieger J.I., Karr, R.W., Gey, H.M.: Single amino acid changes in DR and antigen define residues crinical for peptide-MHC binding and T cell recognition. *The Journal of Immunology* 146 : 2331-2340, 1991.
25. Verreck, F.A.W., Termijtelen, A., Koning, F.: HLA-DRb chain residue 86 controls DR sb dimer stability. *Eur.J.Immunol.* 23 : 1346-1350, 1993.
26. Demotz, S., Barbey, C., Corradin, G.: The set of naturally processed peptides displayed by DR molecules is tuned by polymorphism of residue 86. *Eur.j.Immunol.* 23 : 425-432, 1993.
27. Zamani, M., Cassiman, J.: Reevaluation of the importance of polymorphic HLA class II alleles and amino acids in the susceptibility of indivisuals of different populations to type 1 diabetes. *Am J Med Genet.* 76 : 183-194, 1998.
28. Futami, S., Aoyama, N., Uchihashi, T., Tamura, T., Honsako, Y., Morimoto, S., Nakashima, T., Ohmoto, A., Okano, H., Sakamoto, C., Kasuga, M., Kubota, S., Mitooka, H., Nose, Y.: HLA-DR2 subtyping in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 104 : A538, 1993.
29. Futami, S., Aoyama, N., Tamura, T., Honsako, Y., Morimoto, S., Nakajima, T., Ohmoto, A., Okano, H., Miyamoto, M/, Sakamoto, C., Yasutake, K., Mitooka, H., Amano, M., Maeda, M., KubotamS., Sakatani, N., Nose, Y., Kasuga, M.: HLA-class II DRb -chain position 86 :association with susceptibility to ulcerative colitis. *Gastroenterology* 106 : A684, 1994.
30. 二見佐智子, 青山伸郎 : 遺伝的素因と炎症性腸疾患の発症と病態－HLA-DR 遺伝子を中心に－*医学のあゆみ* 178 : 543-549, 1996.

Ulcerative Colitis and HLA Genes ; Predisposing and Worsing Factor

Sachiko Futami-Oouchi*

*The Second Department of Internal Medicine, Kobe University School of Medicine.

HLA has a strong relationship with the immune reaction as such a genetic predisposing factor of primary importance in understanding the etiology of ulcerative colitis (UC) and the hereditary issues involved. In this study, we analyzed HLA molecules and their relationship with UC by serological typing and DNA typing, and examined any differences between DRB1*1502-positive and -negative UC patients in clinical parameters like onset age, involved extents of UC, its severity and the effectiveness of prednisolone treatment. The incidence of HLA-B52 (49.2% vs 19.1%) and DR15 (66.2% vs 32.4%), were higher in the UC patients than in the control group. DRB1*1502 (52.3% vs 16.3%) DQA1*0103 (53.8% vs 30.1%), DQB1*0601 (58.5% vs 28.7%), and DPB1*0901 (44.6% vs 16.9) were all irregularly linked, and their incidence was higher in UC patients. There was no significant relationship to onset age, extent or severity. The DRB1*1502 positive group required more than 3g of prednisolone every year, and 5g in total. The annual dose of prednisolone was 2.4g in average in the DRB1*1502 positive group, and only 0.48g in the DRB1*1502 negative group. The difference between DRB1*1501 and DRB1*1502 is only one amino acid at position 86 of the HLA-DR β chain, that is, between α and β chain of HLA-class II molecules and affecting peptide binding. We concluded that DRB1*1502 had a strong influence on the susceptibility to UC.