

来ゲノム DNA を用いた全ゲノムスキャン解析実施のため、特に家系内発症例を重視し全国的な検体収集のためのシステムづくりを開始し、検体収集を開始した。現在各種のアプローチで検体集積を継続中であり、目標例数の確保を目指す。

F. 健康危険情報

検体収集は、依頼施設での通常の診療時の採血とともに行われる約 10ml の静脈血採血であり、危険はほとんど伴わない。また、検体は匿名化管理とする等、個人情報保護に十分に配慮する体制を敷いており、これらについては当施設の研究倫理審査においても承認されている。

G. 研究発表

<論文発表>

- Li N, Nakamura K, Jiang Y, Tsurui H, Matsuoka S, Abe M, Ohtsuji M, Nishimura H, Kato K, Kawai T, Atsumi T, Koike T, Shirai T, Ueno H, Hirose S. Gain-of-function polymorphism in mouse and human Ltk: implications for the pathogenesis of lupus erythematosus. *Hum. Mol. Genet.*, 13(2):171-179, 2004
- Endo T, Nakao S, Koizumi K, Nishio M, Fujimoto K, Sakai T, Kuwano K, Obara M, Koike T. Successful treatment with rituximab for autoimmune hemolytic anemia concomitant with proliferation of Epstein-Barr virus and monoclonal gammopathy in a post-non myeloblastic stem cell transplant patient. *Ann. Hematol.*, 83:114-116, 2004
- Yasuda S, Atsumi T, Ieko M, Matsuura E, Kobayashi K, Inagaki J, Kato H, Tanaka H, Yamakado M, Akino M, Saitou H, Amasaki Y, Jodo S, Amengual O, Koike T. Nicked β_2 -glycoprotein I: a marker of cerebral infarct and a novel role in the negative feedback pathway of extrinsic fibrinolysis. *Blood*. 103(10): 3766-3772.2004
- Yamamoto S, Tsuji T, Matsuzaki J, Zhange Y, Chamoto K, Kosaka A, Togashi Y, Sekikawa K, Sawada K, Takeshima T, Koike T, Nishimura T. Unexpected role of TNF- α in graft versus host reaction (GVHR): donor-derived TNF- α suppresses GVHR via inhibition of IFN- γ -dependent donor type-1 immunity. *Int Immunol.* 16: 811-817. 2004
- Endo T, Mogi Y, Koizumi K, Nishio M, Fujimoto K, Sakai T, Kumano K, Obara M, Ikeda H, Koike T. Peripheral blood stem cell mobilization following plus rituximab therapy combined with G-CSF in patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transpl.* 33:703-707. 2004
- Yasuda S, Ogura N, Horita T, Yasuda I, Hioka T, Kondo N, Fujisaku A. Abacterial prostatitis and primary biliary cirrhosis with Sjogren's syndrome. *Mod. Rheumatol.*, 14:70-72, 2004
- Das H, Atsumi T, Fukushima Y, Shibuya H, Ito K, Yamada Y, Amasaki Y, Ichikawa K, Amengual O, Koike T. Diagnostic value of antiagalactosyl IgG antibodies in rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.*, 23:218-222, 2004
- Ieko M, Tarumi T, Takeda M, Nito S, Nakabayashi T, Koike T. Synthetic selective inhibitors of coagulation factor Xa strongly inhibit thrombin generation without affecting initial thrombin forming time necessary for platelet activation in hemostasis. *J. Thromb. Haemost.*, 2: 612-622, 2004
- Amengual O, Atsumi T, Koike T. Antiprothrombin antibodies and the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Clin. Immunol.*, 112:144-149, 2004
- Yang L, Hakoda M, Iwabuchi K, Takeda T, Koike T, Kamatani N, Takada K. Rheumatoid Factors Induce Signaling from B cells, leading to Epstein-barr virus and B-cell activation. *J. Virol.*, 78(18):9918-9923.2004
- Kataoka H, Koike T. Lupus mortality in Japan. *Autoimmun. Rev.*, 3: 421- 422.2004
- Xiao S, Deshmukh SU, Jodo S, Koike T, Sharma R, Furusaki A, Sung JS, Ju Shyr-Tu. Novel negative regulator of expression in Fas Ligand (CD178) Cytoplasmic tail: Evidence for Translational Regulation and against Fas Ligand Retention in secretory lysosomes. *J. Immunol.*, 173: 5095- 5102.2004
- Yasuda S, Atsumi T, Ieko M, Koike T. β_2 -glycoprotein I, anti- β_2 -glycoprotein I, and fibrinolysis. *Thromb Res* 114: 461- 465.2004
- Atsumi T, Amengual O, Yasuda S, Koike T. Antiprothrombin antibodies-are they worth assaying? *Thromb. Res.*, 114: 533-538.2004
- Hashimoto S, Ogawa Y, Ishida T, Mochizuki T, Koike T, Sato H, Ueda T. Steroid-sensitive nephrotic syndrome associated with positive C1q immunofluorescence. *Clin. Exp. Nephrol.*, 8: 266- 269.2004
- Bohgaki M, Atsumi T, Yamashita Y, Yasuda S, Sakai Y, Furusaki A, Bohgaki T, Amengual O, Amasaki Y, Koike T. The p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway mediates induction of the tissue factor gene in monocytes stimulated with human monoclonal anti- β_2 Glycoprotein I antibodies.

Int. Immunol., 16(11):1633- 1641.2004

17. Yasuda S, Atsumi T, Matsuura E, Kaihara K, Yamamoto D, Ichikawa K, Koike T, Significance of valine/leucine²⁴⁷ polymorphism of β 2-glycoprotein I in antiphospholipid syndrome: increased reactivity of anti- β 2-glycoprotein I autoantibodies to the valine²⁴⁷ β 2-glycoprotein I variant. Arthritis Rheum 52:1.212-218.2004
18. Sugiura-ogasawara M, Atsumi T, Ozaki Y, Koike T, Suzumori K. Phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibodies are not useful markers for high-risk woman with recurrent miscarriages. Fertil. Steril., 82:51440-1442.2004

<学会発表>

1. Koike T. "Antiphospholipid Syndrome" 7rd International Congress SLE and Related conditions. New York, USA, May 9-13, 2004
2. Koike T. "Antiphospholipid Syndrome, mechanism of thrombus and complication of reproductive system." 11rd European Congress on Reproductive Immunology. Praha, Czech, June 30- July 3, 2004
3. Koike T. "Antiphospholipid Syndrome mechanism of thrombus and complication of reproductive system." 11rd Asia Pacific League Associations for rheumatology Congress, Jeju, Korea , September 11- 15, 2004
4. Koike T. "Antiprothrombin-is it worth assaying?" 11rd International Congress on Antiphospholipid Antibodies. Sydney, Australia, November 12-19, 2004
5. Koike T. "Pathogenesis of antiprothrombin antibody." 4rd International Congress on Autoimmunity. Budapest, Hungary, November 3-7, 2004

H. 知的財産権の出願・登録
該当無し

‘high-throughput’ゲノム解析システムを用いたSLE感受性遺伝子の同定

白澤 専二（国立国際医療センター研究所・臨床病理研究部・部長）

研究要旨

この研究は、SLEを中心とした自己免疫疾患の疾患感受性遺伝子とその遺伝子変異を同定し病因を解明することを目的とする。この目的を達成するために主任研究者と共同で以下のことを行った。

1) 4p16 候補領域の SLE 感受性遺伝子の同定：

4p16 候補領域に対してマイクロサテライトマーカーと SNP を用い SLE 467 例、対照群 889 例に対して相関解析を行った結果、WHSC2 遺伝子、BST1 遺伝子および STK32B 遺伝子を SLE 感受性遺伝子候補として同定した。

2) 新規感受性遺伝子 FcRH3 の同定：

FcRH3 (Fc receptor homolog 3) の SNP: -169C/T を SLE に対して解析を行い、C/C 遺伝子型は C/T, T/T の遺伝子型より有意に SLE に感受性を示す (OR = 1.49 (95%CI:1.16-1.92), P = 0.0017) ことを明らかにした。さらに、系時的な臨床データのある 120 例の SLE 患者の抗 DNA 抗体価は C/C 遺伝子型で 294.1 (IU/ml), C/T+T/T 遺伝子型で 145.1 (IU/ml) と有意に高い (P<0.026) ことを明らかにした。

A. 研究目的

自己免疫疾患を広義にとらえるとその有病率は約4%にもおよび、難治性であり慢性の経過をたどることを考慮すると、その病因の解明とそれに立脚した治療法の確立は現代医療に課せられた急務である。本分担研究では、全身性自己免疫疾患の代表である全身性エリテマトーデス(SLE)を中心とした自己免疫疾患の疾患感受性遺伝子とその遺伝子変異の同定を行うために、high throughput なゲノム解析システムを構築すること、およびそれを活用して自己免疫疾患感受性遺伝子を同定することを目的としている。この成果は、SLE のみならず関節リウマチ、Graves 病、橋本病なども含めた自己免疫疾患に共通の病因の解明にもつながり、国民の保険・福祉・医療の向上に貢献できると考えられる。

B. 研究方法

1) 4p16 候補領域の SLE 感受性遺伝子の同定：

‘high throughput’なゲノム解析システムを利用して、マイクロサテライトマーカーと SNPs を駆使して、多発家系の解析から得られた感受性遺伝子座の絞り込みと感受性遺伝子の同定を、SLE467 例、対照群 889 例を用いた相関解析で

行った。

2) FcRH3 遺伝子の解析：

SLE 感受性遺伝子領域の 1 番染色体長腕 1q21-q23 に存在する感受性候補遺伝子 FcRH3(Fc receptor homolog 3)に対する解析を SNPs を用いた相関解析で行った。

<倫理面への配慮>

これらの研究では、研究対象者に対する人権擁護に関しては最大の配慮を行い、また、研究による不利益・危険性の可能性とそれらを可能な限り排除する方法等についても、十分な説明を行い、理解して頂いたのちにインフォームド・コンセントの書式で各説明事項にチェックと署名をしてもらう。また、解析に送られてくる検体は既に匿名化がなされている。この研究はヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成 13 年 3 月 29 日：文科省・厚労省・経済産業省告示第 1 号）にのっとり倫理委員会により承認されている。

C. 研究結果

1) WHSC2 領域の詳細な解析：

WHSC2 にはこれまでの解析で SNP C-11282796(T/C) と C-521842(G/A) の二つの SNP が有意差を認めていた。WHSC2 周囲の

SNP についてさらに詳細に解析するために新たに 27 SNPs を設定したが、27 SNPs のなかで解析に利用できた SNP は 8 SNPs だけであった

(11 SNPs は多型のない SNP で、8 SNPs は TaqMan probe の合成が成功しなかった)。解析可能であった 8 SNPs に有意差を認めた C-11282796(T/C) と C-521842(G/A) の二つの SNP を加えて、10 SNPs で、解析対象は SLE 患者 350 人に 117 人増やし、また対照は 616 人に 273 人増やして、合計、SLE 患者 467 人、対照 889 人で患者—対照関連解析を行った。新たに有意差を認めた SNP はなかったが、先の有意差を認めた二つの SNP において、SNP C-11282796(T/C) は、T アレルが患者では対照の 72.07% から 76.86% へ増加し P 値は 0.0069 で有意差を認め、OR は 1.28 (95%CI; 1.07-1.54) であった。T アレルの優性モデルでは、対照の 90.52% から患者では 94.06% と増加し P 値 0.024、OR 1.65 (95%CI; 1.06-2.57) で、T アレルの劣勢モデルでも対照の 53.62% から 59.66% へ増加し P 値 0.032、OR 1.27 (1.02-1.60) と共に有意差を認めた。SNP C-521842(G/A) は、G アレル頻度が対照の 75.81% から患者では 81.61% と増加し P 値は 0.00051 で有意差を認め、OR は 1.41 (95%CI; 1.16-1.72) であった。G アレルの優性モデルでは、対照の 93.33% から患者では 97.04% と増加し P 値 0.0038 と有意で OR は 2.34 (95%CI; 1.29-4.24) であり、また、G アレルの劣性モデルでも対照の 58.29% から患者では 66.17% と増加し P 値 0.0044、OR 1.40 (95%CI; 1.11-1.76) で有意であった。WHSC2 は SLE 感受性候補遺伝子としての可能性が高いと考えられた。

2) BST1 領域の詳細な解析:

これまでの解析で、BST1 遺伝子の SNP C_1223818(A/T) はイントロン 1 に位置する SNP が有意差を認めていた。BST1 遺伝子周囲の SNP についてさらに詳細に解析するために新たに 25 SNPs を設定した。25 SNPs のなかで解析に利用できた SNP は 17 SNPs であった (7 SNPs は多型のない SNP で、1 SNP はタイピングが成功しなかった)。多型を認めた 17 SNPs に、有意差を認めていた C_1223818(A/T) の一つの SNP を加えて、合計 18 SNPs を用いて、SLE 患者 467 人、対照 889 人で患者—対照関連解析を行った。有意差を認めていた C_1223818(A/T) と新たな 5 SNPs の合計 6 SNPs で有意差を認めた。C_1223818(A/T) は、A アレルが患者では対照の 30.70% から 35.38% へ増加し P 値は 0.012 で有意差を認め、OR は 1.23

(95%CI; 1.04-1.46) であった。A アレルの劣性モデルでは、対照の 7.74% から患者では 12.50% と増加し P 値 0.00406、OR 1.70 (95%CI; 1.18-2.45) で有意差を認めたが、A アレルの優性モデルでは有意差を認めなかった。BST1 遺伝子のイントロン 5 に存在する IMS-JST078833(A/G) は、G アレルが患者では対照の 56.65% から 61.33% へ増加し P 値は 0.018 で有意差を認め、OR は 1.21 (95%CI; 1.03-1.42) であった。G アレルの劣性モデルでは、対照の 30.16% から患者では 36.02% と増加し P 値 0.02718、OR 1.304 (95%CI; 1.03-1.65) で有意差を認めたが、G アレルの優性モデルでは有意差を認めていない。BST1 遺伝子の下流約 6.5Kb に存在する IMS-JST175825(A/C) は、A アレルが患者では対照の 33.20% から 40.19% へ増加し P 値は 0.00027 で有意差を認め、OR は 1.35 (95%CI; 1.149-1.591) であった。A アレルの優性モデルでは、対照の 55.99% から患者では 64.35% と増加し P 値 0.0027、OR 1.41 (95%CI; 1.12-1.78) で有意差を認めた。また A アレルの劣性モデルにおいても対照の 10.42% から患者では 16.03% と増加し P 値 0.0026、OR 1.64 (95%CI; 1.18-2.27) で有意差を認めた。BST1 遺伝子の下流約 6.8Kb に存在する IMS-JST037558(T/C) は、C アレルが患者では対照の 38.83% から 43.87% へ増加し P 値は 0.010 で有意差を認め、OR は 1.23 (95%CI; 1.05-1.44) であった。C アレルの優性モデルでは、対照の 62.39% から患者では 70.19% と増加し P 値 0.00393、OR 1.41 (95%CI; 1.11-1.80) で有意差を認めたが、C アレルの劣性モデルでは有意差を認めなかった。BST1 遺伝子の下流約 7Kb に存在する IMS-JST037557(A/G) は、G アレルが患者では対照の 63.83% から 67.69% へ増加し P 値は 0.043 で有意差を認め、OR は 1.18 (95%CI; 1.00-1.40) であった。G アレルの劣性モデルでは、対照の 39.93% から患者では 45.76% と増加し P 値 0.0037、OR 1.26 (95%CI; 1.01-1.58) で有意差を認めたが、G アレルの優性モデルでは有意差を認めなかった。C_1223789 (A/T) は、LOC285550 遺伝子の上流約 3.5Kb にあり、BST1 遺伝子からは上流約 24.8Kb に存在する遺伝子間領域に存在する SNP である。この SNP は、アレル頻度および T アレルの優性モデルでは有意差を認めなかったが、T アレルの劣性モデルにおいて、対照の 0.22% から患者では 1.27% と増加し P 値 0.015、OR 5.75 (95%CI; 1.15-28.63) で有意差を認めた。これらの有意差を認めた 6 つの SNP はいずれもイントロンあるいは遺伝子間領域に存在する SNP であるが C_1223789 (A/T) を除

く5つの SNP は、約 35Kb 以内に集積しており、BST1 も候補遺伝子としての可能性が示唆された。

3) MS[#]336 近傍に存在する遺伝子の SNP 解析:

I) 一次スクリーニング:

MS[#]336 は、KIAA1327 遺伝子のイントロン 8 に位置していたことから、KIAA1327 遺伝子、およびその周囲に存在する 3 遺伝子を候補遺伝子と考え SNP 解析を行った。RAB28 (member RAS oncogene family) 遺伝子に 11SNPs (内 JSNP 3 個)、BAPX1 (bagpipe homeobox homology 1) に 7SNPs (内 JSNP 4 個)、KIAA1327 に 7SNPs (内 JSNP 3 個)、FLJ33215 (hypothetical protein) に 5 SNPs の合計 30 SNPs について患者 350 人、対照 616 人で患者—対照相関解析を行った。SNP のアレル同定は Applied Biosystems 社の Assays-on-Demand プロダクトおよび JSNP に関しては Assays-by-Design サービスによる TaqMan 法にて行った。しかしながら、これら 30SNPs の内で解析に有用な SNP は僅かに、C_1640220(G/A)、C_1640193(G/A)、C_1640184(G/A)、C_2810330(G/A)、C_2967265(T/G)、の 5 つの SNP と 3 つの JSNP JST002403(G/A)、JST154777(G/A)、JST087232(A/G) の合計 8SNPs のみであった。残りの 22SNPs の内、16SNPs (内 7SNPs は JSNP) は多型性のない単一アレルで、5SNPs は患者における minor allele 頻度が 5% 以下の rare allele、また 1SNP はタイピングできないものであった。解析可能であった 8SNPs の内、1st SET 検体の患者 187 人、対照 255 人の解析時点では、BAPX1 遺伝子のイントロン 1 にある JSNP JST002403(A/G) で A アレル頻度が、患者において対照の 53.15% から 57.79% へ増加しており、P 値 0.0453、OR 1.20 (95%CI; 1.00-1.45) で有意差を認めていたが、解析対象数を上記に増やして検討すると、P 値 0.0652 と有意差は認められなくなった。しかしながら、1st SET 検体では認められなかったが、解析対象数を増やすことにより、RAB28 遺伝子内のイントロン 4 に存在する C_1640220(G/A) SNP において、アレル頻度および G アレルの劣性モデルでは有意差は認められないものの、G アレルの優性モデルにおいて、対照の 97.58% から患者では 99.44% と増加し P 値 0.033、OR 4.36 (95%CI; 0.99-19.19) を新たに認めた。

MS[#]336 は当初、KIAA1327 遺伝子の第 8 イントロンに位置することが報告されていたが、

最新のデータベース (build35.1) では KIAA1327 は削除されており、MS[#]336 は、予測遺伝子 LOC285548 と FLJ33215 の遺伝子間領域約 38kb のほぼ中間に位置することになった。RAB28 遺伝子は MS[#]336 の比較的近傍に存在する候補遺伝子として選出してきた遺伝子であるが、LOC285548 と FLJ33215 の遺伝子間ゲノム上に存在する MS[#]336 と有意差を認めた RAB28 遺伝子内のイントロン 4 に存在する C_1640220(G/A) SNP は約 179Kb 離れている。また、C_1640220(G/A) SNP は、RAB28 遺伝子のエクソン 4 からは約 55.2Kb、エクソン 5 からは約 24Kb 離れており、特に mRNA のスプライシング等に関与する可能性はないと考えられた。

II) 2 次スクリーニング:

MS[#]336 周囲に存在する SNP をさらに詳細に検討するため、新たに 40 SNPs を追加設定した。解析対象人数も、SLE 患者 467 人、対照 889 人で患者—対照相関解析を行った。新たに設定した 40 SNPs の中で解析可能であったのは 20 SNPs で、4 SNPs は TaqMan probe の合成ができず、また 16 SNPs は多型性のないものであった。解析可能であった新たな 20 SNP に、1st SET 検体の患者 187 人、対照 255 人の解析において有意差を認めた JSNP、JST002403(A/G) を加えた合計 21 SNPs で解析を行った。JST002403(A/G) は SLE 患者 467 人、対照 889 人の解析においては、A アレル頻度は対照 53.05%、SLE 患者 55.49% と有意差を認めなかった (P=0.2231)。C_2652896(G/T) SNP は、MS[#]336 からは約 320Kb 離れており、予測遺伝子 LOC391634 の上流約 73Kb の遺伝子間領域に存在する SNP であるが、新たに設定した SNP の中ではこの C_2652896(G/T) SNP のみが、G アレルの優性モデルにおいてのみ対照の 17.28% から患者では 21.73% と増加し P 値 0.044、OR 1.32 (95%CI; 1.00-1.75) で弱い有意差を認めた。MS[#]336 周囲の SNP を用いた患者—対照相関解析において、強い相関を示す SNP は認めなかった。また、ハプロタイプ解析で有意差を認めたと仮定しても、MS[#]336 周囲に候補となるような遺伝子は存在しないことを考慮すると、SLE 感受性遺伝子は MS[#]336 周囲には存在しない可能性が示唆される。しかしながら、今回解析できた有用な SNP は非常に少なかったため、これら遺伝子近傍や有意差が認められたマーカー近傍の解析に有用な SNP を独自に探索する必要があると思われた。

4) MS[#]129 近傍に存在する遺伝子の SNP 解析:

MS[#]129 はそのアレル 08 頻度において、対照 10.67%が患者では 6.25%と減少し、P 値は 0.0017 を示したマーカーで、HSA250839 のイントロン 3 に位置している。最近のデータベース (build35.1) では HSA250839 は非受容体型セリン・スレオニンキナーゼをコードする STK32B 遺伝子と再登録されている。STK32B は 12 のエクソンから成り、cDNA の長さは 3224 bp で、414 アミノ酸をコードする遺伝子であるが、ゲノム上では 400Kb を超える遺伝子である。MS[#]129 マーカーはそのほぼ中央に位置しており、周囲 200kb の範囲には STK32B 以外の他の遺伝子はデータベース上登録されていない。STK32B の約 32Kb 上流には免疫関連遺伝子である cytokine-like protein C17 (C17) 遺伝子が存在するが、C17 遺伝子上の 2 つの SNP、C_376560(G/C) SNP および C_376558(T/G) SNP には有意差を認めない。以上のことを考えると、STK32B の相補鎖側に未知の遺伝子の存在は否定できないが、STK32B 遺伝子は現在のところ MS[#]129 に関連するの唯一の候補遺伝子であると考えられる。MS[#]129 近傍の STK32B 遺伝子内に 50 SNPs を設定した。この内 1 SNP は TaqMan probe の合成ができなかったので、49 SNPs (内 JSNP 8 SNPs) を対象にタイピングを行った。49 SNPs の中で 4 SNPs は多型性のない単一アレルであったため 45 SNPs が解析可能であり、SLE 患者 467 人、対照 889 人で患者—対照関連解析を行った。C_2160652(C/G) SNP は、STK32B 遺伝子イントロン 1 内にあり、スプライシングドナーサイトから約 19.3Kb 離れており、Cアレルの優性モデルにおいてのみ対照の 77.74%から患者では 82.98%と増加し P 値 0.022、OR 1.39 (95%CI; 1.04-1.86) で有意差を認めた。C_2160746(A/G) SNP も、STK32B 遺伝子イントロン 1 内にあり、スプライシングアクセプターサイトから約 13Kb 離れており、G アレル頻度が患者では対照の 17.1%から 20.5%へ増加し P 値は 0.029 で有意差を認め、OR は 1.24 (95%CI; 1.02-1.52)であった。Gアレルの優性モデルにおいては対照の 30.7%から患者では 36.8%と増加し P 値 0.022、OR 1.31 (95%CI; 1.04-1.66)で有意差を認めたが、Gアレルの劣性モデルにおいては有意差を認めなかった。C_2160833(A/G) SNP は、イントロン 3 内にあり、スプライシングドナーサイトから約 46.7Kb 離れている。Gアレルの優性モデルにおいてのみ対照の 0.55%から患者では 1.68%と増加し P 値 0.038、OR 3.08 (95%CI; 1.00-9.46)で有意差を

認めたが、Gアレル頻度およびGアレルの劣性モデルにおいては有意差を認めなかった。C_2160835(A/C) SNP も、イントロン 3 内にあり、スプライシングドナーサイトから約 48.8Kb 離れている。Aアレル頻度においてのみ対照の 60.8%から患者では 65.0%と増加し P 値 0.031、OR 1.19 (95%CI; 1.01-1.41)で有意差を認めたが、Aアレルの優性モデルおよび劣性モデルにおいては有意差を認めなかった。C_15939130(A/G) SNP も、イントロン 3 内にあり、スプライシングドナーサイトから約 49.2Kb 離れている。Aアレル頻度において対照の 61.2%から患者では 65.9%と増加し P 値 0.017、OR 1.22 (95%CI; 1.03-1.44) で有意差を認め、また Aアレルの優性モデルにおいても対照の 83.4%から患者では 88.2%と増加し P 値 0.017、OR 1.49 (95%CI; 1.07-2.08)で有意差を認めたが、Aアレル劣性モデルにおいては有意差を認めなかった。C_2972041(A/G) SNP は、イントロン 4 内にあり、スプライシングアクセプターサイトから約 4Kb 離れている。Gアレルの劣性モデルにおいてのみ対照の 76.7%から患者では 81.4%と増加し P 値 0.045、OR 1.32 (95%CI; 1.00-1.75)で有意差を認めたが、Gアレル頻度およびGアレルの優性モデルにおいては有意差を認めなかった。C_2972030(A/G) SNP は、イントロン 5 内にあり、スプライシングアクセプターサイトから約 8.2Kb 離れている。Gアレルの優性モデルにおいてのみ対照の 96.6%から患者では 98.7%と増加し P 値 0.024、OR 2.66 (95%CI; 1.09-6.43)で有意差を認めたが、Gアレル頻度およびGアレルの劣性モデルにおいては有意差を認めなかった。以上のように、MS[#]129 が存在する STK32B 遺伝子内の七つの SNP に有意差を認めたいずれもイントロン内の SNP であった。

5) 1q21-q23 候補領域の感受性遺伝子の同定: FcRH3 の同定

一番染色体長腕 1q21-q23 領域は SLE、関節リウマチ(RA)を含む複数の自己免疫疾患に共通の感受性遺伝子が存在すると考えられている。RIKEN との共同研究により、RA と対照群による SNP 解析により感受性遺伝子の候補として FcRH3 (Fc receptor homolog 3) を同定した。相関を示した SNP の内、FcRH3 の転写開始点より 153bp 上流に存在する SNP:-169C/T が RA と最も強く相関し、感受性アレルである-169C は非感受性アレルである-169T に比較し、より強固に免疫応答の重要な転写因子である NFkappaB が結合することが明らかとなった。この SNP:-169C/T を SLE に対して解析した結果、C/C 遺伝子型は C/T, T/T の遺伝子型より有意に SLE に感受性を示す (OR = 1.49

(95%CI:1.16-1.92), $P=0.0017$) ことが明らかとなった。さらに、系時的に臨床データのある120例のSLE患者の抗DNA抗体価はC/C遺伝子型で294.1 (IU/ml), C/T+T/T遺伝子型で145.1 (IU/ml)と有意に高い ($P<0.026$) 事を明らかにした。さらに、-169Cは自己免疫性甲状腺疾患 (AITD) とも相関することを明らかにした。これらの結果からFcRH3はRAのみならず、SLE, AITDの複数の自己免疫疾患感受性遺伝子であること、および、自己抗体産生に関与することが示唆された。

D. 考察

WHSC2は、成長障害、精神発達障害、小脳症、口唇口蓋裂、心臓中隔欠損症などを引き起こす奇形症候群の候補遺伝子として知られている。WHSC2は、その構造において、デルタ肝炎ウイルスのデルタ抗原と類似配列を持っており、RNA転写において、RNA polymerase IIの抑制因子として作用することが報告されている。WHSC2の二つのSNP、C_11282796およびC_521842において、いずれのSNPもそれぞれイントロン4およびイントロン1とイントロンに存在するSNPではあるが、アレル頻度、疾患感受性アレルの優性モデルおよび劣性モデルのいずれの解析においても有意差を認めていることから、SNPの塩基変化がWHSC2自体の発現量などに影響し、自己免疫疾患の発症に関与する遺伝子の転写に関与している可能性も考えられる。BST1遺伝子のSNP C-1223818(A/T)はBST1遺伝子のイントロン1にあるSNPで、スプライシングドナーサイトからは1834 bp、アクセプターサイトからは347 bp 離れており直接スプライシングに関与する位置ではないが、遺伝子発現に関与する可能性も示唆される。また、IMS-JST078833(A/G)はイントロン5に存在するが、スプライシングアクセプターサイトから8 bpしか離れておらずmRNAのスプライシングに影響する可能性は否定できない。IMS-JST175825(A/C) IMS-JST037558(T/C)、IMS-JST037557(A/G)の三つのSNPはいずれもBST1遺伝子の下流10 Kb以内に存在するが、イントロンに存在する有意差を認めたC_1223818(A/T)、IMS-JST078833(A/G)の二つのSNPを含めた5 SNPsはBST1遺伝子を含む34 Kbの範囲に集積している。BST1遺伝子はpre-B-cell growthに関与する可能性が報告されており、約46kb離れて存在するCD38遺伝子とアミノ酸配列上相同遺伝子の関係にあることが知られてい

る。また、BST1遺伝子は、SLEと同じ自己免疫疾患である関節リウマチ患者由来の骨髄間質細胞株において、その発現が増加しているとの報告がある。BST1遺伝子上のゲノム多型により、BST1遺伝子の機能や発現量に変化が生じ、このことがSLE発症と関与している可能性は否定できない。WHSC2およびBST1領域の解析においては複数のSNPにおいて有意差を認めたが、更なる解析対象および解析SNP数の増加とハプロタイプ解析が有用であると思われる。MS#336近傍のSNP解析ではRAB28遺伝子の一つのSNP C_1640220(G/A)で相関を認めたが、MS#336から約179k離れていること、また、RAB28遺伝子のエクソン4からは約55.2Kb、エクソン5からは約24Kb離れており、特にmRNAのスプライシング等に関与する可能性は低いこと、P値が0.0335とそれほど低値ではないこと、Gアレルの優性モデルだけしか有意差が認められないこと、近傍のSNPでは有意差が認められないこと等を考慮すると、RAB28の候補遺伝子としての可能性は高くないと思われる。また、C_2652896(G/T)SNPもGアレルの優性モデルにおいてのみ極弱い相関をみとめたが、MS#336からは約320 Kb離れ、最も近い遺伝子LOC391634の約73 Kb上流の遺伝子間領域に存在していることから、MS#336が直接関与する可能性は低いと思われた。MS#336自体は、予測遺伝子LOC285548とFLJ33215の遺伝子間領域約38kbのほぼ中間に位置しており、相補鎖上に未知の遺伝子が存在する可能性は否定できないが、現在のところMS#336が直接関与すると考えられる候補遺伝子は存在しないと思われた。MS#129近傍の候補遺伝子は現在のところSTK32Bのみと思われる。STK32Bは非受容体型セリン・スレオニンキナーゼであることから、標的蛋白の活性やシグナル伝達に関与していることが予想され、SLE発症に関係する可能性が機能上示唆される。STK32B遺伝子内のSNP解析において、7つのSNPに有意差を認めたが、いずれのSNPもイントロン内にあり、またいずれもmRNAのスプライシングに直接影響するような位置ではなかった。しかしながら、ゲノム上約450Kbの範囲で存在するSTK32B遺伝子内にはMS#129も含めると、合計8つのマーカーに有意差を認めたことになる。これら有意差を認めたイントロン内のSNPあるいはそれらと連鎖不平衡にある別のSNPがSTK32Bの発現・機能に関与している可能性は否定できず、更なる詳細な解析が必要と考えられた。FcRH3がRAのみならず、SLE, AITDの複数の自己免疫疾患感受性遺伝子であること、さら

に、自己抗体産生に関与する現象は興味深く、複数の自己免疫疾患に関与する共通の遺伝子が存在することが示唆された。

E. 結論

1) 4p16 候補領域の SLE 感受性遺伝子の同定:

4p16 候補領域に対してマイクロサテライトマーカー、SNP を用い SLE467 例、対照群 889 例に対して相関解析を行った結果、WHSC2、BST1、STK32B 遺伝子を SLE 感受性遺伝子の候補として同定した。

2) 新規感受性遺伝子 FcRH3 の同定:

FcRH3 (Fc receptor homolog 3) に存在し関節リウマチと相関を示す SNP:-169C/T の C/C 遺伝子型は C/T, T/T の遺伝子型より有意に SLE に感受性を示す (OR = 1.49) ことを明らかにした。さらに、抗 DNA 抗体価は C/C 遺伝子型において C/T+T/T 遺伝子型より有意に高いことを明らかにした。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

< 論文発表 >

1. Klampfer L, Swaby L-A, Huang J, Sasazuki T, Shirasawa S, Augenlicht L. Oncogenic Ras increases sensitivity of colon cancer cells to 5-FU-induced apoptosis. *Oncogene*, in press, 2005
2. Hiratani H, Bowden DW, Ikegami S, Shirasawa S, Shimizu A, Iwatani Y, Akamizu T. Multiple SNPs in intron 7 of thyrotropin receptor are associated with Graves' disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, in press, 2005
3. Kochi Y, Yamada R, Suzuki A, Harley JB, Shirasawa S, Sawada T, Bae S-C, Tokuhiko S, Chang X, Sekine A, Takahashi A, Tsunoda T, Ohnishi Y, Kaufman KM, Kang CP, Kang C, Otsubo S, Yumura W, Mimori A, Koike T, Nakamura Y, Sasazuki T, Yamamoto K. A functional variant in FcRH3, encoding Fc Receptor Homolog 3, is associated with rheumatoid arthritis and several autoimmunities. *Nature Genet.*, in press, 2005
4. Caron RW, Yacoub A, Mitchell C, Zhu X, Hong Y, Sasazuki T, Shirasawa S, Hagan MP, Grant S, Dent P. Radiation-stimulated ERK1/2 and JNK1/2 signaling can promote cell cycle progression in human colon cancer cells. *Cell Cycle*. 28:4(3), 2005
5. Caron RW, Yacoub A, Li M, Zhu X, Mitchell C, Hong Y, Hawkins W, Sasasaki T, Shirasawa S, Kozikowski AP, Dennis PA, Hagan MP, Grant S, Dent P. Activated forms of H-RAS and K-RAS differentially regulate membrane association of PI3K, PDK-1 and AKT and the impact of therapeutic kinase inhibitors on cell survival. *Mol. Cancer Ther.*, 4(2):257-70, 2005
6. Caron RW, Yacoub A, Zhu X, Mitchell C, Han SI, Sasazuki T, Shirasawa S, Hagan MP, Grant S, Dent P. H-RAS V12-induced radioresistance in HCT116 colon carcinoma cells is heregulin dependent. *Mol. Cancer Ther.*, 4(2):243-55, 2005
7. Mabuchi R, Sasazuki T, Shirasawa S. Mapping of the critical region of mitogene-inducible gene-6 for NK- κ B activation. *Oncol. Rep.*, 13(3):473-6, 2005
8. Yu JL, May L, Lhotak V, Shahrzad S, Shirasawa S, Weitz JI, Coomber BL, Mackman N, Rak JW. Oncogenic events regulate tissue factor expression in colorectal cancer cells: Implications for tumor progression and angiogenesis. *Blood*, 105(4):1734-41, 2005
9. Onimaru H, Arata A, Arata S, Shirasawa S, Cleary ML. In vitro visualization of respiratory neuron activity in the newborn mouse ventral medulla. *Brain Res Dev Brain Res.*, 153(2): 275-279, 2004
10. Nawata H, Shirasawa S, Nakashima N, Araki E, Hashiguchi J, Miyake S, Yamauchi T, Hamaguchi K, Yoshimatsu H, Takeda H, Fukushima H, Sasahara T, Yamaguchi K, Sonoda N, Sonoda T, Matsumoto M, Tanaka Y, Sugimoto H, Tsubouchi H, Inoguchi T, Yanase T, Wake N, Narazaki K, Eto T, Umeda F, Nakazaki M, Ono J, Asano T, Ito Y, Akazawa S, Hazegawa I, Takasu N, Shinohara M, Nishikawa T, Nagafuchi S, Okeda T, Eguchi K, Iwase M, Ishikawa M, Aoki M, Keicho N, Kato N, Yasuda K, Yamamoto K, Sasazuki T. Genome-wide linkage analysis of type 2 diabetes mellitus reconfirms the Susceptibility locus on 11p13-p12 in Japanese. *J. Hum. Genet.*, 49:629-634, 2004
11. Shichijo S, Keicho N, Long HT, Quy T, Phi NC, Ha LD, Ban VV, Itoyama S, Hu CJ, Komatsu N, Kirikae T, Kirikae F, Shirasawa S, Kaji M, Fukuda T, Sata M, Kuratsuji T, Itoh K, Sasazuki T. Assessment of synthetic peptides of severe acute respiratory syndrome coronavirus recognized by long-lasting immunity. *Tissue antigens*, 64(5):6007-607, 2004

12. Shirasawa S, Sugiyama S, Baba I, Inokuchi J, Sekine S, Ogino K, Kawamura Y, Dohi T, Fujimoto M, Sasazuki T. Dermatitis due to epiregulin deficiency and a critical role of epiregulin in immune-related responses of keratinocyte and macrophage. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 101(38):13921-13926, 2004
13. Shirasawa S, Harada H, Furugaki K, Akamizu T, Ishikawa N, Ito K, Ito K, Tamai H, Kuma K, Kubota S, Hiratani H, Tsuchiya T, Baba I, Ishikawa M, Tanaka M, Sakai K, Aoki M, Yamamoto K, Sasazuki T. SNPs in the promoter of a B cell-specific antisense transcript, SAS-ZFAT, determine susceptibility to autoimmune thyroid disease. Hum. Mol. Genet., 13(19):2221-2231, 2004
14. Cheng L, Arata A, Mizuguchi R, Qian Y, Karunaratne A, Gray PA, Arata S, Shirasawa S, Bouchard M, Luo P, Chen CL, Busslinger M, Goulding M, Onimaru H, Ma Q. TLx3 and TLx1 are post-mitotic selector genes determining glutamatergic over GABAergic cell fates. Nature Neurosci., 7(5):510-517, 2004
15. Klampfer L, Huang J, Sasazuki T, Shirasawa S, Augenlicht L. Oncogenic Ras Promotes butyrate-induced apoptosis through inhibition of gelsolin expression. J. Biol. Chem., 279(35):36680-36688, 2004
16. Asano N, Fujimoto M, Yazawa N, Shirasawa S, Hasegawa M, Okochi H, Tamaki K, Tedder TF, Sato S. B Lymphocyte Signaling Established by the CD19/CD22 Loop Regulates Autoimmunity in the Tight-Skin Mouse. Am. J. Pathol., 165:641-650, 2004.
17. Qi X, Tang J, Pramanik R, Schultz RM, Shirasawa S, Sasazuki T, Han J, Chen G. p38 MAPK activation selectively induces cell death in K-ras mutated human colon cancer cells through regulation of vitamin D receptor. J. Biol. Chem, 279(21) :22138-22144, 2004
18. Furugaki K, Shirasawa S, Isikawa N, Ito K, Ito K, Kubota S, Kuma K, Tamai H, Akamizu T, Hiratani H, Tanaka M, Sasazuki T. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with Graves' disease and autoimmune thyroid disease in the Japanese. J. Hum. Genet., 49 (3) :166-168, 2004
19. Inokuchi J, Komiya M, Baba I, Naito S, Sasazuki T, Shirasawa S. Deregulated expression of KRAP, a novel gene encoding actin-interacting protein, in human colon cancer cells. J. Hum. Genet., 49 (1): 46-52, 2004
20. Yamamoto K, Sonoda M, Inokuchi J, Shirasawa S, Sasazuki T. Polycomb group, Suppressor of Zeste 12, links heterochromatin protein 1alpha and enhancer of Zeste 2. J. Biol. Chem., 279 (1): 401-406, 2004
- <学会発表>
1. Shirasawa S. "Genetic analysis on autoimmune thyroid disease." "Genome analysis and Medicine"-The 13th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience, Tokyo, December 6-8, 2004
 2. 杉山滋, 馬場賀, 猪口淳一, 関根さやか, 荻野景子, 河村由紀, 土肥多恵子, 藤本学, 笹月健彦, 白澤専二. Epiregulin のケラチノサイトとマクロファージにおける免疫関連機能の解明. 日本分子生物学会, 神戸, 2004年12月8日-11日
 3. 白澤専二. 自己免疫疾患および拒食症のゲノム解析—罹患同胞対解析および pooled DNA 法を用いた全ゲノムスクリーニング—. 第33回遺伝医学研究会(東京女子医大), 東京, 2004年11月26日
 4. 柳内和幸, 竹内史比古, 松尾恵, 長野忍, 猪又兵衛, 渡邊岳博, 森居俊行, 柳内圭子, 安田和基, 白澤専二, 笹月健彦, 加藤規弘. 染色体20番長腕での2型糖尿病感受性遺伝子の網羅的探索. 日本人類遺伝学会第49回大会, 東京, 2004年10月12-15日
 5. 原田晴仁, 石川繭子, 天崎吉晴, 小池隆夫, 中村道子, 三森明夫, 笹月健彦, 白澤専二. 4番染色体短腕上のSLE疾患感受性遺伝子の解明. 日本人類遺伝学会第49回大会, 東京, 2004年10月12-15日
 6. 石川繭子, 小牧元, 摂食障害遺伝子研究協力者会議, 猪子英俊, 田宮元, 笹月健彦, 白澤専二. ABI3730DNA アナライザを用いた全ゲノムスクリーニング法における摂食障害感受性遺伝子の探索. 日本人類遺伝学会第49回大会, 東京, 2004年10月12日-15日
 7. 白澤専二. Pooled DNA 法を用いた全ゲノムスクリーニングによる摂食障害感受性遺伝子の解明. JBIC2004 プロジェクト成果報告会, 東京, 2004年10月
 8. 馬淵麗子, 角田俊之, 笹月健彦, 白澤専二. Mig-6 の NF κ B 活性化誘導に関わる領域の同定. 第63回日本癌学会学術総会, 福岡, 2004年9月
 9. 白澤専二. 自己免疫性甲状腺疾患のゲノム解析. 第11回日本遺伝子診療学会大会, 東京, 2004年9月(シンポジウム)

H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

- 1.特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

SLE の孤発例を対象とした検体収集システムの確立

三森 明夫（国立国際医療センター・膠原病科・医長）

研究要旨

SLE ゲノム解析に対応する臨床形質を分類した。病態の頻度は、SLE 一般における頻度にほぼ一致したので、SLE 症例が偏りなく収集され、ゲノム統計解析に適したものと考えられた。

A. 研究目的

ゲノムデータと比較する資料として SLE 症例の臨床形質を分類する。

あり；5例、重複算定はせず。この5例中1例は母に RA あり v ほかに姉に自己免疫性肝炎あり；1例）。

B. 研究方法

匿名化した症例の臨床形質を記録した。

<倫理面への配慮>

ヒトゲノム研究倫理指針に従った。

D. 考察

病態の表現型の各頻度は、SLE 一般における頻度とほぼ一致した。中枢神経ループスの頻度は、報告ごとに大きく異なるが、今回の集計では、治療対象になる明確なものに限った。

C. 研究成果

ゲノム解析計画のための血液採取した97例の、下記の各項目からなる臨床形質を調査分類した（SLE94例、健常同胞3例）。

なお、1例において、ループス腎炎と血小板減少が、プレドニゾン治療で軽快しつつある経過中に広範囲の皮膚血管炎を生じ、同力価のデキサメサゾンに置き換えて軽快した。一般に、ステロイド製剤による有効性に個人差があることはしばしば観察され、遺伝的差異の可能性を暗示するが、本例の結果からは、病態の差が影響する可能性も示唆された。

<病態の表現型>

ループス腎炎56例（生検実施34、再生検6例／組織型の改善1例）；ループス腎炎例の抗DNA抗体陽性率96%、中枢神経ループス7例、自己免疫性血小板減少30例、自己免疫性溶血性貧血2例、皮膚血管炎3例、間質性肺炎4例、肺高血圧症2例（抗RNP抗体陽性1、不明1）、心筋障害2例、ループス膀胱炎4例。
シェーグレン症候群合併；あり21、なし43；合併率21/64（33%）。

<家族歴>

自己免疫性疾患の家族歴あり；6例（姉妹に SLE

E. 結論

収集したサンプルはゲノム解析の対象として適切と考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kimura H, Komatsuda A, Sawada K, Mimori A, Baba S, Minota S: Rapidly progressed secondary amyloidosis in a patient with mixed connective tissue disease. Int Med 43:878-882, 2004

2. 学会発表

- 大川雅子, 青塚新一, 長汐千秋, 狩野俊和, 伊藤健司, 三森明夫: 関節リウマチ患者における血中抗環状シトルリンペプチド抗体価の経時的変動. 第48回日本リウマチ学会総会 岡山, 4月, 2004
- 長汐千秋, 松田寿久, 狩野俊和, 伊藤健司, 青塚新一, 三森明夫: 狭窄を伴わず拡張のみで発症した高安動脈炎の一例. 第48回日本リウマチ学会総会 岡山, 4月, 2004

3. 長汐千秋, 松田寿久, 狩野俊和, 伊藤健司, 青塚新一, 三森明夫: 血管炎による難治性皮膚潰瘍の治療. 第48回日本リウマチ学会総会 岡山, 4月, 2004
4. 狩野俊和, 松田寿久, 長汐千秋, 伊藤健司, 青塚新一, 三森明夫: CMVに伴う血小板減少. 第48回日本リウマチ学会総会 岡山, 4月, 2004

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

候補遺伝子アプローチによる SLE 疾患感受性遺伝子の探索

土屋 尚之（東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学分野・助教授）

研究要旨

B細胞の抑制型受容体である CD72 遺伝子の多型解析と関連研究を施行したところ、第8イントロンに13塩基の反復配列と4塩基挿入を持つハプロタイプが、選択的スプライシングの結果細胞外領域の約40アミノ酸が変化するアイソフォームの産生増加と関連し、かつ、SLEにおける腎症合併に対し抵抗性に働くことを見出した。さらに、この多型は、やはりB細胞の抑制型受容体であり、われわれが過去にSLEとの関連を報告したFcγ受容体IIb(FCGR2B)-232Thr多型のSLE発症リスクを、遺伝子間相互作用により有意に減少させることを見出した。また、ミニジーン・アッセイにより、CD72第8イントロンに存在する13塩基の反復配列と4塩基挿入のいずれもがスプライシング効率に関与することを見出した。また、APRIL(TNFSF13)の多型解析と関連解析を施行したところ、c.199A/A(p.67Arg/Arg)遺伝子型のSLEにおける有意な減少が観察され、Koyamaら(九大)による先行研究の結果を独立に確認し得た。さらに、3'非翻訳領域にSNP(c.*263C>T)が検出され、SLE群におけるTアリルの増加傾向が観察され、抗Sm抗体陽性群では有意差に到達した。c.*263TアリルのmRNA量は、Cアリルと比較して有意に増加していた。

A.研究目的

われわれは、昨年度までに、B細胞の抑制型受容体であるFcγRIIBの膜貫通領域にアミノ酸置換を伴う多型Ile232Thr(I232T)を見出し、232Tアリルが日本人、タイ人、中国人集団において全身性エリテマトーデスと関連する一方、ヨーロッパ系アメリカ人集団ではアリル頻度が低く、関連も確認されないことを報告した。また、機能的・位置的候補遺伝子であるBAFF(BLyS, TNFSF13B)関連遺伝子群について、系統的な多型解析と関連研究を施行してきた。

本年度は、FcγRIIB同様、B細胞の抑制型受容体であるCD72の多型解析と関連研究を、FcγRIIBとの遺伝子間相互作用を念頭におきつつ解析し、さらに、CD72多型の機能についても検討した。また、BAFFの類縁分子であるAPRIL(TNFSF13)については、Koyamaら(九州大学)により、Gly67ArgとSLEとの関連が報告されている(Rheumatology 2003)。APRILは細胞内で切断され、分泌される分子であるが、当該多型部分は細胞内に残存する部分であるため、近傍の第一義的に病態に関与する多型部位との連鎖不平衡によって関連が検出された可能性や、発現量、切断の効率に影響する可能性が考えられる。本研究では、これらの可能性を検討するために、染色体上隣接して位置し、TNFスーパーファミリーに属する遺伝子で、APRILとの遺伝子間スプライシングにより融合遺伝子TWE-PRILを形成しうるTWEAK(TNFSF12)を含めた系統的な多型解析

により、さらなる解析を試みた。また、疾患関連多型が遺伝子発現におよぼす影響を検討した。

このような研究は、SLEの病因・病態解明を介して診断・治療に貢献しうるとともに、日本人を対象とした個別化医療の実現の基礎となるものである。

B.研究方法

CD72の関連解析は、日本人SLE患者160例、対照健常者277例、タイSLE患者87例、対照健常者187例につき、患者対照法で施行した。

末梢血単核球より得たRNAをRT-PCRにて検討し、CD72のスプライシング・アイソフォームを存在と、その通常型との相対的な量比を解析した。

CD72第8イントロン多型と選択的スプライシングとの関連を明らかにするために、第7エクソンから第9エクソンまでの遺伝子断片を組み込んだミニジーンを作製し、COS-7細胞に導入し、RT-PCRによりスプライシング産物を解析した。

通常型(common)および選択的スプライシング型(alternatively spliced, AS)アイソフォームの蛋白産物の存在を、両者に相当するcDNAをCOS-7細胞に導入し、両者に共通する細胞内領域に対する抗体を用いたwestern blottingで解析した。

APRIL および TWEAK については、日本人 SLE157 例、健常者 168 例を用いた患者対照研究を施行した。また、ヘテロ接合体供血者の末梢血を用いた RNA difference plot (RDP)法により、mRNA 量をアリル特異的に比較した。さらに、フローサイトメトリーにより、各遺伝子型の細胞内 APRIL タンパク量を比較した。

(倫理面への配慮)

これらの研究は、東京大学大学院医学系研究科および共同研究施設の研究倫理審査委員会の承認を得た研究計画に従い、匿名化した検体を用いて行われた。

C.研究結果

1) CD72

CD72 には 10 個所の変異が検出され、うち 4 個所が多型の定義に相当する頻度で認められた。これら 4 個所の多型部位は、ほぼ完全な連鎖不平衡により、日本人集団では 2 種の主要ハプロタイプを形成して存在した (図 1)。以後の解析では、ハプロタイプ・タグ多型として、第 8 イントロンの 13 塩基反復配列 (1 回を*1, 2 回を*2) を利用した。

SLE との関連解析では、SLE 全体との関連は検出されなかったが、SLE 群を腎症の有無により層別化すると、腎症を有する群において、*2 アリルおよび*2/2 ハプロタイプの有意な減少が認められた (表 1)。タイ人集団においても、ほぼ同様の傾向が検出された。

4 個所の多型部位のうちの 2 個所 (13 塩基反復配列、4 塩基欠失) が第 8 イントロンに位置していたため、これらの多型がスプライシングに影響する可能性を、末梢血単核球を用いた RT-PCR 法により解析したところ、第 8 エクソンを欠失した新規スプライシング・アイソフォーム (AS 型) が検出された。AS 型は、通常型アイソフォームにおいてはストップコドンを持つ第 8 エクソンの欠失により、C 末端側 42 アミノ酸が、新たな 49 アミノ酸に変化した蛋白をコードすると予測され、実際に蛋白として翻訳されることが、AS 型 cDNA 導入 COS-7 細胞において確認された (図 2)。

次に、遺伝子型とスプライシング効率の関連を検討したところ、腎症抵抗性の*2 ハプロタイプに、遺伝子量依存的に AS 型 mRNA が増加することが見出された (図 3)。第 7 エクソンから第 9 エクソンまでの遺伝子断片導入 COS-7

細胞を用いたミニジーン・アッセイにより、第 8 イントロンの 13 塩基反復配列、4 塩基欠失のいずれもがスプライシング効率に影響することが確認された。

最後に、CD72 同様 B 細胞の抑制型受容体である Fcγ受容体 IIb (FCGR2B) 遺伝子において、われわれが昨年度までに SLE との関連を報告した c.695T>C (Ile232Thr) について、CD72 多型との遺伝子間相互作用を検討したところ、CD72 の*2 アリル陽性例では、FCGR2B-232Thr 多型による発症リスクが有意に減弱することが見出された (表 2)。

2) APRIL

翻訳領域に既報の 2 個所の非同義置換 c.199G>A (Gly67Arg)、c.287A>G (Asn96Ser) が検出され、さらに、プロモータ領域、非翻訳領域、イントロンに計 4 個所の多型が検出された。67Arg/Arg 遺伝子型の有意な減少が観察され、Koyama ら (2003) の報告を独立に確認し得た。臨床病型との関連を検討したところ、抗 Sm 抗体陽性 SLE 群において、3' 非翻訳領域に位置する c.*263T の有意な増加が観察された。

TWEAK には 6 個所の多型部位が検出され、APRIL 多型との間に連鎖不平衡が認められたが、SLE との有意な関連は認められなかった。

APRIL 多型と mRNA 発現量の関連を検討したところ、c.*263T アリルの mRNA 量が、C アリルに対し有意に増加していた。一方、c.199G>A については、mRNA レベルでも、細胞内 APRIL 蛋白量にも、多型との有意な関連が検出されなかった。

D.考察

本研究は、転写後修飾に影響するゲノム DNA 多型が、遺伝子多型間相互作用を介して疾患感受性を修飾する、という 2 点において、ポスト・シーケンシング時代の疾患研究におけるゲノム・ネットワーク解析の重要性を象徴的に示したものである。

CD72 と FcγRIIb はいずれも B 細胞受容体 (BCR) からのシグナルに抑制的に作用する分子であるが、FcγRIIb 活性化のためには BCR からの陽性シグナルが必要であるため、CD72 の AS 型アイソフォーム産物が BCR 近位において BCR シグナルを抑制することにより、FcγRIIb 多型の効果を消失させる可能性が考えられる。CD72 は II 型膜結合蛋白であるため、AS 型産

物では、細胞外領域の42アミノ酸が全く新たな49アミノ酸に置換される。これがリガンドとの結合や細胞における局在に影響し、抑制効果増強する可能性を、現在検討中である。

APRIL-Gly67Arg 多型と SLE との関連は、Koyamaら(九大)によって2003年に報告されている。今回、われわれの研究により、独立に確認されたことにより、日本人集団におけるSLE 感受性遺伝子の一つである可能性がきわめて高くなったと考えられる。当該部位は、APRIL 分泌時に、切断され、細胞側に残る部分であるために、その機能的意義は不明である。今回、連鎖不平衡の可能性も考え、隣接するTWEAK をも含めた多型解析を行ったが、Gly67Arg 自体が第一義的である可能性が高いという結論に至った。興味深いことに、Gly67Arg とは連鎖不平衡にない3'非翻訳領域のSNPが、mRNA量の増加を介して、抗Sm抗体陽性SLEと有意に関連することが示された。われわれは以前、BAFF mRNAレベルの増加に関連するSNPがやはり抗Sm抗体陽性群に増加傾向にあることを報告しており(Kawasaki et al., 2002)、今回の結果を考え合わせると、BAFF/APRIL系がSm抗体産生に遺伝的に寄与する可能性が示唆された。

E. 結論

CD72イントロン多型が、スプライシング効率に影響することにより、細胞外領域に位置する約40アミノ酸の置換を伴う新たなアイソフォームの産生を増加させ、それ自体で腎症抵抗性と関連し、かつ、遺伝子間相互作用により、FCGR2B多型のSLE発症リスクを修飾することが明らかになった。また、APRILとSLEとの既報の関連が確認され、さらに、新たなAPRIL多型と臨床病型との関連が示唆された。(研究協力者)人見祐基、川崎綾、大橋順、徳永勝士(東大人類遺伝)、京極千恵子(ミネソタ大医学部)、鈴木毅、河野肇、本田善一郎(東大アレルギーリウマチ内科)、深沢徹、草生真規雄、橋本博史(順天堂大膠原病内科)、村上善則(国立がんセンター研究所)、Sasitorn Bejrachandra, Usanee Siriboonrit, Dasnayanee Chandanayingyong, Puan Suthipinittharm (マヒドン大学)、Betty P. Tsao (UCLA)

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. Hase H, Kanno Y, Kojima M, Hasegawa K, Sakurai D, Kojima H, Tsuchiya N, Tokunaga K, Masawa N, Azuma M, Okumura K, Kobata T: BAFF/BLyS can potentiate B-cell selection with the B-cell co-receptor complex. *Blood* 103:2257-2265, 2004.
2. Sakurai D, Tsuchiya N, Yamaguchi A, Okaji Y, Tsuno NH, Kobata T, Takahashi K, Tokunaga K: Crucial role of inhibitor of DNA binding/differentiation in the vascular endothelial growth factor-induced activation and angiogenic processes of human endothelial cells. *J Immunol* 173:5801-5809, 2004.
3. Hitomi Y, Tsuchiya N, Kawasaki A, Kyogoku C, Ohashi J, Suzuki T, Fukazawa T, Bejrachandra S, Siriboonrit U, Chandanayingyong D, Suthipinittharm P, Tsao BP, Hashimoto H, Honda Z, Tokunaga K. CD72 polymorphisms associated with alternative splicing modify susceptibility to human systemic lupus erythematosus through epistatic interaction with FCGR2B. *Hum Mol Genet* 13: 2907-2917, 2004.
4. Tsuchiya N, Kuroki K, Fujimoto M, Murakami Y, Tedder TF, Tokunaga K, Takehara K, Sato S. Association of functional CD19 polymorphism with susceptibility to systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 50: 4002-4007, 2004.
5. Ehara Y, Sakurai D, Tsuchiya N, Nakano K, Tanaka Y, Yamaguchi A, Tokunaga K: Follistatin-related protein gene (FRP) is expressed in the synovial tissues of rheumatoid arthritis, but its polymorphisms are not associated with genetic susceptibility. *Clin Exp Rheumatol* 22: 707-712, 2004.
6. Okaji Y, Tsuno NH, Kitayama J, Saito S, Takahashi T, Kawai K, Yazawa K, Asakage M, Tsuchiya T, Sakurai D, Tsuchiya N, Tokunaga K, Takahashi K, Nagawa H. A novel method for isolation of endothelial cells and macrophages from murine tumors based on Ac-LDL uptake and CD16 expression. *J Immunological Methods* 295:183-193, 2004.
7. Tsuchiya N, Kyogoku C: Role of Fcγ Receptor IIb polymorphism in the genetic background of systemic lupus erythematosus: Insights from Asia. *Autoimmunity* (in press)

2. 学会発表

1. 土屋尚之: 顕微鏡的多発血管炎の疾患感受

- 性遺伝子解析。第48回日本リウマチ学会総会・学術集会 抄録集 p105。2004年4月15日～17日、岡山。
2. 江原幸和、土屋尚之、櫻井大祐、山口晃弘、松多邦雄、徳永勝士：ヒト follistatin-related protein (FRP) 遺伝子多型の関節リウマチとの関連の検討。第48回日本リウマチ学会総会・学術集会 抄録集 p152。2004年4月15日～17日、岡山。
 3. 人見祐基、土屋尚之、川崎綾、深沢徹、松多邦雄、Betty P. Tsao, 橋本博史、徳永勝士：ヒト CD72 遺伝子の多型解析と、全身性エリテマトーデスおよび関節リウマチとの関連の検討。第48回日本リウマチ学会総会・学術集会 抄録集 p175。2004年4月15日～17日、岡山。
 4. 黒木喜美子、土屋尚之、松多邦雄、深沢徹、十字猛夫、橋本博史、徳永勝士：白血球免疫グロブリン様受容体 LILRA1(LIR6) 遺伝子多型と日本人 SLE との関連。第48回日本リウマチ学会総会・学術集会 抄録集 p175。2004年4月15日～17日、岡山。
 5. 川崎綾、土屋尚之、深沢徹、松多邦雄、橋本博史、徳永勝士：APRIL 遺伝子多型と関節リウマチ、全身性エリテマトーデスとの関連の検討。第48回日本リウマチ学会総会・学術集会 抄録集 p181。2004年4月15日～17日、岡山。
 6. 申栄吉、櫻井大祐、土屋尚之、川崎綾、小端哲二、徳永勝士：ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞における BlyS(BAFF) 発現。第48回日本リウマチ学会総会・学術集会 抄録集 p284。2004年4月15日～17日、岡山。
 7. 櫻井大祐、土屋尚之、山口晃弘、小端哲二、徳永勝士：VEGF 誘導性血管内皮細胞活性化および血管新生誘導における ID 遺伝子の役割。第48回日本リウマチ学会総会・学術集会 抄録集 p299。2004年4月15日～17日、岡山。
 8. 人見祐基、土屋尚之、川崎綾、京極千恵子、大橋順、鈴木毅、深沢徹、Sasitorn Bejrachandra, Dasnayanee Chandanayingyong, Puan Suthipinittharm, Betty P. Tsao, 橋本博史、本田善一郎、徳永勝士：SLE 感受性におけるヒト CD72 遺伝子多型およびヒト FcγR2B 遺伝子多型の遺伝子間相互作用。日本人類遺伝学会第49回大会抄録集 p107 (2004年10月12日～15日)。
 9. 土屋尚之、黒木喜美子、村上善則、藤本学、Thomas F. Tedder, 徳永勝士、竹原和彦、佐藤伸一：CD19 の機能的多型と全身性強皮症との関連。日本人類遺伝学会第49回大会抄録集 p148 (2004年10月12日～15日)。
 10. Tsuchiya N, Kuroki K, Murakami Y, Fujimoto M, Tedder TF, Tokunaga K, Takehara K, Sato S: Association of functional CD19 promoter polymorphism with susceptibility to systemic sclerosis. Arthritis Rheum 50(Suppl.): S125, 2004.
 11. Kawasaki A, Tsuchiya N, Fukazawa T, Matsuta K, Murakami Y, Hashimoto H, Tokunaga K. APRIL (TNFSF13) polymorphisms: in systemic lupus erythematosus: Independent confirmation of association with susceptibility and new association with clinical characteristics. Arthritis Rheum 50(Suppl.): S120, 2004. Arthritis Rheum 50(Suppl.): S203, 2004.
 12. Hitomi Y, Tsuchiya N, Kawasaki A, Kyogoku C, Ohashi J, Suzuki T, Fukazawa T, Bejrachandra S, Chandanayingyong D, Suthipinittharm P, Tsao BP, Hashimoto H, Honda Z, Tokunaga K: Epistatic interaction between CD72 and FCGR2B polymorphisms in conferring susceptibility to human systemic lupus erythematosus (SLE). Arthritis Rheum 50(Suppl.): S120, 2004.
 13. Kusaoi M, Fukazawa T, Hirashima M, Morita Y, Morita T, Tsuchiya N, Tokunaga K, Inoko H, Hashimoto H: Genomic screening with high density microsatellite markers for systemic lupus erythematosus on chromosome 1. Arthritis Rheum 50(Suppl.): S121, 2004.
 14. 申栄吉、土屋尚之、櫻井大祐、長谷英徳、津野寛和、高橋孝喜、小端哲二、徳永勝士 血管内皮細胞および血管平滑筋細胞における BAFF(BLyS) 発現。第34回日本免疫学会 (学術集会記録 p162) , 2004.
 15. 黒木喜美子、土屋尚之、白石充典、ラズバラリング、山下由美、小池隆夫、神田大輔、徳永勝士、前仲勝実 関節リウマチ(RA)関連 Leukocyte Immunoglobulin-like receptor (LIR) 1 ハプロタイプの構造・発現解析。第34回日本免疫学会 (学術集会記録 p162) , 2004.
 16. 川崎綾、土屋尚之、深沢徹、橋本博史、徳永勝士 APRIL(TNFSF13) 遺伝子多型と SLE 発症および病態との関連の解析。第34回日本免疫学会 (学術集会記録 p279) , 2004.
 17. 人見祐基、土屋尚之、川崎綾、鈴木毅、深沢徹、Bejrachandra S, Chandanayingyong D,

- Suthipinittharm P, Tsao BP, 橋本博史、本田善一郎、徳永勝士 SLE 感受性におけるヒト CD72 遺伝子多型およびヒト FCGR2B 遺伝子多型の遺伝子間相互作用。第34回日本免疫学会（学術集会記録 p279）, 2004.
18. 土屋尚之、黒木喜美子、藤本学、Tedder TF, 徳永勝士、佐藤伸一 ヒト CD19 多型と強皮症との関連。第34回日本免疫学会（学術集会記録 p284）, 2004.
19. 宮下リサ、土屋尚之、屋部登志雄、小林茂人、橋本博史、尾崎承一、徳永勝士 KIR 遺伝子多型と顕微鏡的多発血管炎(MPA)との関連の検討。第34回日本免疫学会（学術集会記録 p284）, 2004.
20. 屋部登志雄、宮下リサ、八幡真人、八幡信代、Parham P, 土屋尚之、徳永勝士 ヒトNK細胞受容体 KIR, LIR 多型性と骨髄移植成績への影響。第34回日本免疫学会（学術集会記録 p331）, 2004.
21. 草生真規雄、深沢徹、平島美賀、守田優子、頭山尚子、土屋尚之、徳永勝士、猪子英俊、橋本博史 高密度のマイクロサテライトマーカーを用いた1番染色体における全身性エリテマトーデスの疾患感受性遺伝子の解析。第34回日本免疫学会（学術集会記録 p256）, 2004.
22. 黒木喜美子、白石充典、ラズバラリンダ、土屋尚之、徳永勝士、神田大輔、前仲勝実 関節リウマチ（RA）関連 Leukocyte Immunoglobulin-like Receptor (LIR) 1 ハプロタイプの構造・発現解析。第27回日本分子生物学会（抄録集 p995, 3PB-407）, 2004.

H.知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

表1 日本人 SLE および健常対照者における CD72 遺伝子型

	全 SLE (n=160)		腎症合併 SLE(n=92)		腎症非合併 SLE (n=65)		健常対照群 (n=277)	
遺伝子型頻度								
*1/*1	51	(31.9)	34	(37.0)	16	(24.6)	98	(35.4)
*1/*2	82	(51.3)	47	(51.1)	33	(50.8)	125	(45.1)
*2/*2	27	(16.9)	11	(12.1)	16	(24.6)	54	(19.6)
アリル頻度								
*1	184	(57.5)	115	(62.5)	65	(50.0)	321	(57.8)
*2	136	(42.5)	69	(37.5)	65	(50.0)	233	(42.2)
アリル保有者頻度								
*1	133	(83.1)	81	(88.0)	49	(75.4)	223	(80.5)
*2	109	(68.1)	58	(63.0)	49	(75.4)	179	(64.6)

腎症合併 SLE と腎症非合併 SLE の比較::

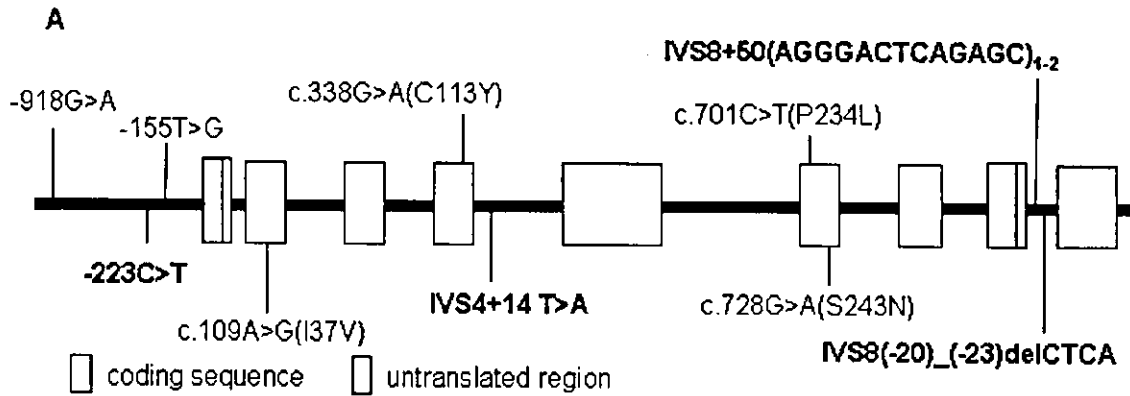
遺伝子型頻度: $\chi^2=5.08$, $P=0.024$ (Armitage's test for trend), アリル頻度: $\chi^2=4.87$, $P=0.027$,

*1 アリル陽性率: $\chi^2=4.29$, $P=0.038$.

表2 CD72 と FCGR2B の遺伝子型の組み合わせによる SLE 感受性。

FCGR2B	CD72		
	*1/*1	*1/*2	*2/*2
Thr/Thr	4.63(1.47-14.6)	1.60(0.67-3.86)	1.58(0.32-7.90)
Ile/Thr	0.80(0.41-1.55)	1.33(0.73-2.42)	0.77(0.26-2.34)
Ile/Ile	0.89(0.49-1.61)	0.91(0.52-1.58)	1

日本人集団、タイ人集団におけるデータをメタアナリシスの方法で統合した。表の数値は、FCGR2B-Ile/Ile, CD72 *2/*2 の組み合わせと比較した場合の、各遺伝子型の組み合わせのオッズ比と 95%信頼区間である。いずれの集団においても FCGR2B Thr/Thr 遺伝子型は単独で有意な関連を示すが、CD72 遺伝子型と組み合わせた場合、関連は CD72 *1/*1 の存在下においてのみ有意差に到達する。



B

haplotype	-233	IVS4+14	IVS8VNTR	IVS8(-20)_(-23)
1	C	T	1 repeat (*1)	-
2	T	A	2 repeat (*2)	CTCA

図1 (A) ヒト *CD72* に検出された変異。太字は多型に相当する頻度で認められたもの。
 (B) 4個所の多型部位によって形成されるハプロタイプ。日本人 *CD72* 遺伝子型は、大部分がこの2つの主要ハプロタイプによって説明された。

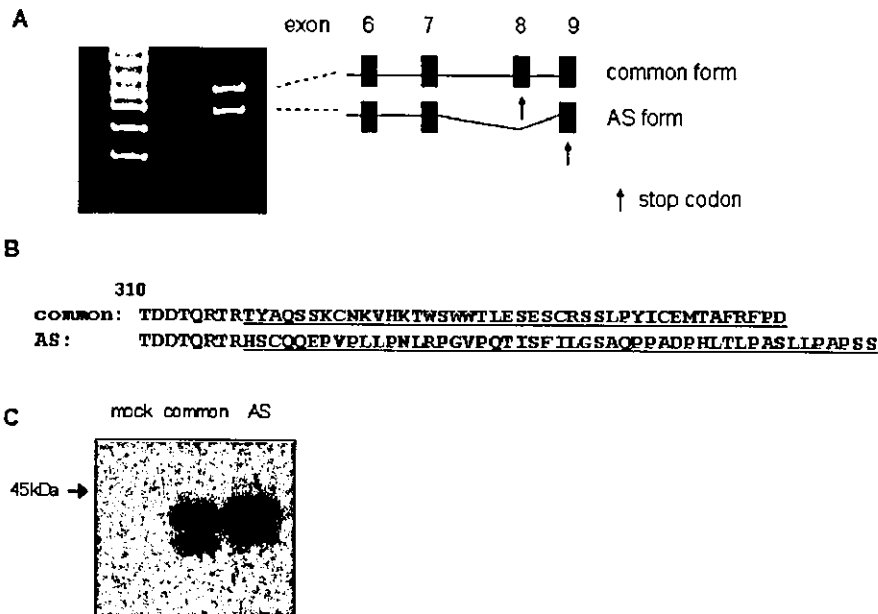


図2 *CD72* に見出された新規のスプライシング・アイソフォーム。(A) ヒト末梢血単核球の由来のRNAを用いたRT-PCR。短い断片の塩基配列決定により、第8エクソンを欠失したアイソフォームであることが確認された。(B)通常型および第8エクソン欠失型(AS型)アイソフォームの予測されるアミノ酸配列。置換される部分を下線で示す。(C) 通常型およびAS型 *CD72* cDNA 全長をCOS-7細胞に導入し、細胞質領域を認識する抗体による免疫プロット法で蛋白産物を確認した。それぞれの2本のバンドは、糖鎖修飾の違いによるものと思われる。

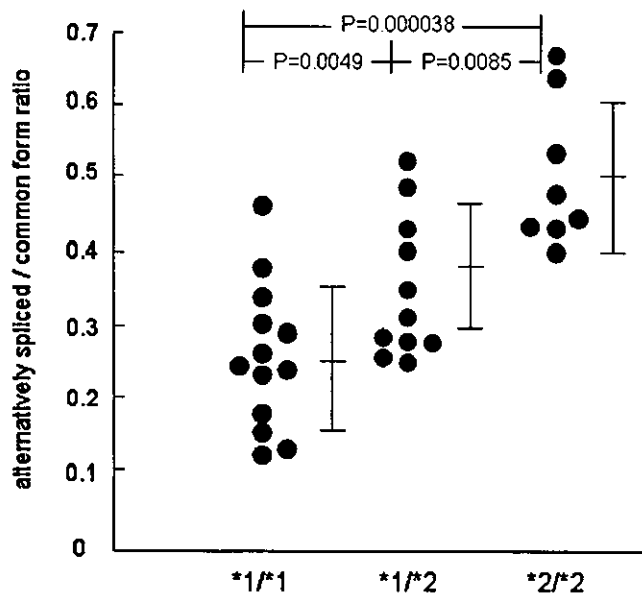


図3 *CD72* 遺伝子型とスプライシング効率の関連。末梢血単核球の RT-PCR により、AS 型/通常型比を算出し、プロットした。