厚生労働科学研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

関節リウマチ関連遺伝子の同定とその機能解析、相互関連の研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

平成18年3月

主任研究者　山 本 一 彦

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
総括研究報告書

関節リウマチ関連遺伝子の同定とその機能解析、相互関連の研究

主任研究者　山本　一彦　東京大学大学院医学系研究科アレルギーリウマチ学

研究要旨　患者個人と社会に重大な影響を与えている関節リウマチの疾患感受性遺伝子をゲノムワイドの一塩基多型（SNP）関連解析で進めた結果、複数の遺伝子を同定できた。これらの遺伝子の機能を詳細に分析することが、RA の病因の検索、新しい治療法の開発、オーダーメイド医療を推進するために重要と考えられる。そこで個々の遺伝子の機能を解析すると同時に、患者情報との対比、遺伝子同士の相互作用などを検討するための基礎的検討を開始した。

分担研究者
井上　和彦　東京女子医科大学東医療ｾﾝﾀｰ 教授
山田　　亮　京都大学医学研究科附属ｹﾞﾉﾑ医学ｾﾝﾀｰ　助教授
高地　雄太　理化学研究所横浜研究所遺伝子多型研究ｾﾝﾀｰ　研究員
沢田　哲治　東京大学医学部附属病院ｱﾚﾙｷﾞｰﾘｳﾏﾁ内科　助手
駒形　嘉紀　東京大学医学部附属病院ｱﾚﾙｷﾞｰﾘｳﾏﾁ内科　助手
川畑　仁人　東京大学医学部附属病院ｱﾚﾙｷﾞｰﾘｳﾏﾁ内科　助手
神田　浩子　東京大学医学部附属病院ｱﾚﾙｷﾞｰﾘｳﾏﾁ内科　助手

A. 研究目的

関節リウマチ（RA）の原因は不明であり、多発関節炎を主体とするが血管炎、間質性肺炎などの全身性の疾病である。RA の罹患は個人の生活の質に重大な影響を及ぼすだけでなく、国家の経済にも多大な負担を強いており、最近の米国の試算では就業不可能になることの損失や医療費を含めて年間3兆円の負担があり、これは癌全体の 50% に及ぶとされている。すなわち、RA の原因の究明、適切な治療法の開発、普及は急務である。

RA の原因としての遺伝的な寄与は約60%と計算されており、大きな要因である。遺伝的要因を解明する研究は各国で行われているが、HLA-DR 遺伝子以外はかなり難しい状態である。しかし、HLA-DR 以外の RA 関連遺伝子の研究も RA の病因、病態の解明、新しい治療法の開発と個人の特徴に応じた医療の実現などに重要である。

疾患関連遺伝子解析では候補遺伝子的なアプローチの限界が指摘されており、仮説なしの全ゲノム解析が1つの方向である。10年ほど前から積極的に推進されてきた罹患同胞対解析に代表される家系を用いた方法は、絞り込める範囲を十分に狭めることができず、最終的な回答まで到達することが難しい可能性が議論されている。これに対してケース（患者集団）とコントロール（健常人集団）での多型頻度を比較する関連解析が多因子疾患の解析に有望視されている。

我々はゲノムワイドに一塩基多型（SNP）での関連解析を推進している理化学研究所遺伝子多型研究センターと共同で、RA関連遺伝子として PADI4、SLC22A4，RUNX1FCRL3 を同定し報告した（Nature Genetics 34:395-402, 2003、Nature Genetics 35:341-348, 2003、Nature Genetics 37:478-485, 2005)。しかし、これまでの研究はRAに関係する遺伝子の重要性を明らかにしただけであり、どうして RA の病態と関係があるのか、複数の関連遺伝子間に相互作用があるのか、これらの遺伝子多型の組み合わせで RA の疾病としてタイプが異なるのか、治療薬に対する反応に違いがあるのか、などについては不明のままである。

そこで本研究では、それぞれの遺伝子の機能を詳細に探索し、その機能に関連する分子群とその遺伝子多型を明らかにしつつ、複数の関連遺伝子間の相互作用、HLA-DR 遺伝子型との関係を明らかにし、将来的にRAの疾患としてのタイプ分け、治療薬との反応など、ゲノム情報を今後の RA 診療に直結させるシステムを構築することを目的とした。

B. 研究方法 及び C. 研究結果

１．Peptidylarginine deiminase (PADI)4 の機能解析

我々は RA の疾患関連遺伝子として、全ゲノムスクリーニングによるものとしては世界で初めて、第１染色体に eptidylarginine deiminase (PADI)4 遺伝子を同定した（Nature Genetics 34:395-402, 2003）。PADI はペプチド中のアルギニンをシトルリンに変換する酵素である。一方我々の解析とは別に欧州の研究者が抗シトルリン化自己抗体が RA に非常に特異性が高いことを報告していた。これら２つの研究から、現在では蛋白のシトルリン化とそれに対する免疫応答が RA の原因または増悪と密接に結びついていることが世界的にも認識されるようになっている。しかし、PADI4 遺伝子がどのように RA と関連しているかの詳細は全く不明のままである。

そこで PADI 4がシトルリン化する蛋白を同定する目的で、RA 滑膜由来および軟骨由来の cDNA ライブラリーをフィルター上に展開し、そこにリコンビナント PADI4 蛋白を反応させシトルリン化し、そのシトルリン化蛋白を RA 患者血清由来抗シトルリン化抗体で検出することで、RA の滑膜中でシトルリン化され、かつ自己免疫応答の標的となっている分子を同定した。まず滑膜由来ライブラリーからは I 型コラーゲンが (Suzuki A. et al. BBRC 333:418-426, 2005.)、軟骨由来ライブラリーからは eukaryotic translation initiation factor 4G1（elF 4G1）（Okazaki Y. et al. BBRC 341:94-100, 2006) が同定された。例えば、リコンビナント elF 4G1 をシトルリン化すると約 50%の RA 患者血清がこれと反応した。この感度は市販の抗CCP抗体キットに比べると高くはないが、抗CCP抗体と同様に高い特異性を示し、RA以外の健常人およびRA以外の膠原病患者血清ではほとんど反応が見られなかった。さらに PADI4 感受性ハプロタイプを持つ RA 患者は持たない患者に比べて抗シトルリン化 elF 4G1 抗体を持つ頻度が高いことが判明した。これらのことから、すでに記載されているフィブリノージェン、ビメンチンなどとともに、RA患者のシトルリン化蛋白抗体の標的は単一ではないことが判明した。

生体内には５つの PADI 分子が存在する。

それぞれの発現臓器は異なるが、RA の病変である滑膜組織には PADI2 と PADI4 が発現している。その中で PADI4 が病因に関連していることの意味を追求する目的で、リコンビナントの PADI2 と PADI4 の酵素活性の違いを検討した（Nakayama-Hamada M. et al. BBRC 327:192-200,2005）。その結果、両者とも Ca 濃度依存性に酵素活性が変化するが、その濃度に違いがあり、至適 pH の違い、フィブリノージェン中のアルギニンのシトルリン化のされかたなどに違いがあることが判明した。すなわち、二つの酵素は生理的、病理的に異なる作用を持っていることが推測された。

一方、蛋白がシトルリン化されることで、チャージの変化から非共有結合が影響を受け立体構造が大きく変わることが推定されている。そこで、自己の抗原の抗原性が変化し、免疫寛容の破綻から抗シトルリン化蛋白抗体が産生され、それが関節炎に繋がると考えられているが、それ以外の可能性もあり得る。そこで、関節炎増悪の可能性を考え、血管新生、フィブリン形成、炎症に関与するトロンビンとそれを抑制するアンチトロンビンに注目した。RA 患者の血清中にはシトルリン化されたアンチトロンビンが多く、シトルリン化アンチトロンビンは抗トロンビン活性が低下することを示した（Chang X. et al. Rheumatology 44:293-298, 2005）。すなわち、これは免疫応答を介さなくてもシトルリン化が関節炎の増悪に関与できる可能を示したものである。

PDAI4 のトランスジェニックマウスとノックアウトマウスの作成は進行中であるが、現在複数回の試行でも高発現のトランスジェニックは得られず、高発現することが致死的である可能性が出てきた。

2. SLC22A4(Solute Carrier Family 22 Member 4)の機能解析

第５染色体の 5q31 領域に RA 関連遺伝子として SLC22A4(Solute Carrier Family 22 Member 4)があることを報告した（Nature Genetics 35:341-348, 2003）。SLC22A4 は、有機カチオンを輸送する分子として知られているが、その輸送基質は同定されておらず、生理的な機能も不明である。次に SLC22A4 のイントロン１にある SNP を含む配列が転写調節機能を有し、SNP のアレルの別によってその転写効率が変化することを明らかにした。この転写調節配列について解析したところ、転写因子である RUNX1 が結合することが明らかとなり、SNP のアレルの別によって RUNX1 の結合度が変化することが確認された。さらに RUNX1 にも RA と関連する SNP を発見した。興味深いことに、全身性エリテマトーデスおよび乾癬でも RUNX1 の結合度により疾患関連遺伝子の発現が影響を受けることが報告されており、RUNX1 と自己免疫疾患に何らかの関係があるのではないかと推定されている。

最近、SLC22A4 のアミノ酸変化を伴うミスセンス変異およびこれと強い連鎖不平衡にある SLC22A5 の 5'UTR の SNP がクローン病と相関していることが判明し、有機カチオントランスポーターと炎症疾患との関係が注目されるに至っている。

そこで現在、SLC22A4 をノックダウンすることが、炎症反応関連分子の発現に影響を与えるか否かを検証している。一過性のノックダウンにより、IL-8 遺伝子発現が亢進したことから、現在恒常的発現低下を目指して、コンストラクトを作成中である。

3．民族差の問題

PADI4 に関しては、日本、韓国で我々とは独立した研究組織による追試で、我々の結果が確認された。しかし、英国をはじめとする欧米では、追試による確認がとれないとの報告が多い。この原因として、遺伝子頻度の違い、環境と遺伝子の相互作用、遺伝子間の相互作用などが考えられる。実際に米国から発表された RA 関連遺伝子 PTPN22 遺伝子多型は、日本人、中国人では多型そのものが存在しないことを見いだした（Mori M et al. J Hum Genet 50:264-266, 2005)。このような民族間の相互比較情報は重要である。そこで、米国、韓国、オランダなどの研究者とともに共同研究で短時間に情報交換するシステムを立ち上げつつある。ただし、PADI4 に関しては、Kamatani らによるメタ解析で、欧米人でも RA の関連することが明らかにされつつある。

（倫理面への配慮）

ヒトゲノムを用いた解析を含むことから、ヒトゲノム解析・遺伝子解析研究に関する倫理指針に則り、倫理委員会の審査を経た上で、研究を遂行した。

D. 考察

PADI 4 による自己蛋白のシトルリン化と RA における自己免疫疾患との関係については、次のように考えられる。シトルリン化した自己ペプチドに対する自己抗体の出現は RA に特異的な現象であり、かつ、RA の発病のごく初期から認められる。さらに、5 タイプ知られる PADI 遺伝子のうち、PADI 4 は、免疫・血球系細胞で発現していること、RA 滑膜で発現していること、また RA の感受性ハプロタイプは、mRNA の安定性が高く、抗シトルリン化ペプチド抗体の産生を亢進することが推測されている。すなわち、ある一定の条件下で PADI4 によるシトルリン化が亢進し、その結果、自己ペプチドのシトルリン化の質と量に変化が生じ、免疫寛容の破綻を来たす。その結果抗シトルリン化ペプチド抗体の産生に代表される自己免疫反応が始まり、RA の発病へと至る。

この仮説は、RA とシトルリン化に関わる自己免疫反応を説明するものであるが、不明な点も多い。PADI の生理学的役割、シトルリン化の制御、シトルリン化ペプチドに対する免疫寛容の最初のきっかけとなる自己分子、シトルリン化ペプチドに対する免疫寛容の破綻をもたらすその他の分子や遺伝子、シトルリン化ペプチドに対する自己免疫反応が成立した後の自己免疫反応を持続させる因子などである。特に HLA-DR4 を含む PADI4 以外の遺伝因子は、シトルリン化関連自己免疫反応の成立にどのような役割を果たしているのか、さらに RA における自己免疫反応の成立はシトルリン化に関するものですべてが説明できるのかなども全く不明である。これらに関して、来年度以降も研究を推進することで、RA に関連する自己免疫反応や RA の病因そのものの解明が進むとともに、RA の診断的・治療的進展が大いに期待される。

E. 結論

PADI4, SLC22A4 についての機能解析を進めた。現在、東京女子医科大学の井上和彦教授とともに、より詳細な RA の病態情報をもつ患者 DNA サンプルの収集システムの構築を進めており、これらを通して今後遺伝子多型とのより詳細な関係の検討ができるものと期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Okazaki Y, Suzuki A, Sawada T, Ohtake-Yamanaka M, Inoue T, Hasebe T, Yamada R, Yamamoto K. Idetification of citrullinated eukaryotic translation initiation factor 4G1 as novel autoantigen in rheumatoid in rheumatoid arthritis. Biochem Biophys Res Commun. 341:94-100, 2006.

2. Kochi Y, Yamada R, Suzuki A, Harley JB, Shirasawa S, Sawada T, Bae SC, Tokuhiro 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 FCRL3, encoding Fc receptor-like 3, is associated with rheumatoid arthritis and several autoimmunities. Nature Genet. 37:478-485, 2005.

3. Chang X, Yamada R, Suzuki A, Sawada T, Yoshino S, Tokuhiro S, Yamamoto K. Localization of peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) and citrullinated protein in synovial tissue of rheumatoid arthritis. Rheumatology. 44: 40-50, 2005.

4. Nakayama-Hamada M, Suzuki A, Kubota K, Takazawa T, Ohsaka M, Kawaida R, Ono M, Kasuya A, Furukawa H, Yamada R, Yamamoto K. Comparison of enzymatic properties between hPADI2 and hPADI4. Biochem Biophys Res Commun. 327: 192-200, 2005.

5. Kawaida R, Yamada R, Kobayashi K, Tokuhiro S, Suzuki A, Kochi Y, Chang X, Sekine A, Tsunoda T, Sawada T, Furukawa H, Nakamura Y, Yamamoto K. CUL1, a component of E3 ubiquitin ligase, alters lymphocyte signal transduction with possible effect on rheumatoid arthritis. Genes Immun. 6:194-202, 2005.

6. Yamada R, Yamamoto K. (Review) Recent findings on genes associated with inflammatory disease. Mutation Res. 573: 136-151, 2005.

7. Mori M, Yamada R, Kobayashi K, Kawaida R, Yamamoto K. Ethnic differences in allele frequency of autoimmune-disease-associated SNPs. J Hum Genet. 50:264-266, 2005.

8. Suzuki A, Yamada R, Ohtake-Yamanaka M, Okazaki Y, Sawada T, Yamamoto K. Anti-citrullinated collagen type I antibody is a target of autoimmunity in rheumatoid arthritis. Biochem Biophys Res Commun. 333:418-426, 2005.

9. Yamamoto K, Yamada R. Genome-wide single nucleotide polymorphism analyses of rheumatoid arthritis. J Autoimmun. 25:12-15, 2005.

10. YamadaR. Peptidylarginine deiminase type 4, anticitrullinated peptide antibodies, and rheumatoid arthritis.Autoimmun. Rev.4: 201-206, 2005

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

Ⅱ. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

複合遺伝性疾患としての関節リウマチの遺伝因子解析の理論研究とその実践的活用

分担研究者　山田　亮　京都大学大学院医学研究科附属ゲノム医学センター
疾患ゲノム疫学解析分野　助教授

研究要旨　SNPを用いた連鎖不平衡マッピングを推進し、新規手法を適用するための研究体制・データ解析環境の整備を進めた。また、連鎖不平衡マッピングの新規探索手法の開発のための予備的検討を行った。

A. 研究目的

関節リウマチ感受性遺伝因子の解析により、関節リウマチ病理・自己免疫現象・自己免疫疾患の機構解明・新規臨床応用の可能性を探索するための遺伝統計学・集団遺伝学的解析手法の検討と開発を行う。

B. 研究方法

複数のローカス・複数の遺伝子の相互作用を解明することをひとつのテーマとし、そのための解析手法の導入と評価を行う。また、新規手法の開発を目指す。本年度は、エピスタシスを検出・検定する手法として提唱されている Muliple Dimension Reduction (MDR) 法を導入し、それを関節リウマチ関連遺伝子解析に適用する場合の実行上の問題点を検討する。

（倫理面への配慮）　ヒトゲノム情報を用いた解析であるので、ヒトゲノム解析の指針に則り、計画の審査・承認手続きを進めている。

C. 研究結果

連鎖不平衡マッピングの基盤整備として、SNPを用いた連鎖不平衡マッピングを行うための基礎的な手法を大規模データに適用するための解析環境整備を以下のように行った。

- Pairwise LD
  - r2 を中心に D'を併用
- LD block
  - Solid Spine of LD を中心に Gabriel 法、Four gamete test 法を併用
- Recombination rate 推定
  - Coalescent model based-RJMCMC
- Haplotype 推定
  - PLEM
  - SNPHAP
  - Phase
  - EM for 2-individual pooled data
- 関連検定
  - 単一 SNP・ハプロタイプ アレル頻度分割表検定
  - 一般線形回帰法・尤度解析 (尤度比検定とスコア検定)
  - Permutation 補正
- TagSNP 選別
  - r2-greedy 法
  - Optinum solution 法

また、MDR 法を WINDOWS 環境に導入し、典型的なエピスタシスの検出をする場合の、基本的動作の評価を行った。また、１０-５０ローカスにつき、１０００人か

ら２０００人規模でのシミュレーションデータを作成し、処理速度についての検討を行った。同時にエピスタシスの評価のための、シミュレーショナルなジェノタイプデータを作成するためのツールの構築を行った。

D. 考察

SNP を用いた連鎖不平衡マッピングを実施するための、基本的解析環境の整備が進んだ。また、新規手法の開発の予備的検討が終了した。

E. 結論

関節リウマチのゲノム解析を推進し、新規解析手法を適用する基盤の整備を進めており、その具体化に向けた次年度に向けた計画策定を行う段階である。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Association of a single-nucleotide polymorphism in the immunoglobulin μ-binding protein 2 gene with immunoglobulin A nephropathy/J. Hum. Genet.50 30-35 2005/OhtsuboS. IidaA. NittaK. TanakaT. YamadaR. OhnishiY. MaedaS. TsunodaT. TakeiT. ObaraW. AkiyamaF. ItoK. HondaK. UchidaK. TsuchiyaK. YumuraW. UjiieT. NaganeY. MiyanoS. SuzukiY. NaritaI. GejyoF. FujiokaT. NiheiH. and NakamuraY.

2. Comparison of enzymatic properties between hPADI2 and hPADI4/Biochem. Biophys. Res. Commun.327 192--200 2005/NakayamaM. HoriguchiA. S. KubotaK. TakazawaT. OhsakaM. KawaidaR. OnoM. KasuyaA. FurukawaH. YamadaR. and YamamotoK.

3. Inhibition of antithrombin by hyaluronic acid may be involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis/Arthritis Res. Ther. 7 R268--R273 2005/ChangX. YamadaR. and YamamotoK.

4. Recent findings on genes associated with inflammatory disease/Muta. Res./Fund. Mol. Mech. Mutagen.573 136--151 2005/YamadaR. and YamamotoK.

5. Peptidylarginine deiminase type 4, anticitrullinated peptide antibodies, and rheumatoid arthritis/Autoimmun. Rev.4 201--206 2005/YamadaR.

6. Anti-citrullinated collagen type I antibody is a target of autoimmunity in rheumatoid arthritis/ Biochem. Biophys. Res. Commun.333 418--426 2005/SuzukiA. YamadaR. YamanakaM. OkazakiY. SawadaT. and YamamotoK.

7. Ethnic differences in allele frequency of autoimmune-disease-associated SNPs/J. Hum. Genet. 50 264--266 2005/MoriM. YamadaR. KobayasiK. KawaidaR. and YamamotoK.

8. A functional variant in FCRL3, encoding Fc receptor-like 3, is associated with rheumatoid arthritis and several autoimmunities/Nat. Genet.37 No. 5 478--485 2005/KochiY. YamadaR. SuzukiA. HarleyJ. B. ShirasawaS. SawadaT. BaeS. TokuhiroS. ChangX. SekineA. TakahashiA. TsunodaT. OhnishiY. KaufmanK. M. KangC. P. KangC. OstuboS. YumuraW. MimoriA. KoikeT. NakamuraY. SasazukiT. and YamamotoK.

9. Anti-citrullinated collagen type I antibody is a target of autoimmunity in rheumatoid arthritis/ Biochem. Biophys. Res. Commun.333 418--426 2005/SuzukiA. YamadaR. YamanakaM. OkazakiY. SasadaT. and YamamotoK.

10. Peptidylarginine deiminase 4(PADI4)

identified as a conformation-dependent autoantigen in rheumatoid arthritis/Scand J Rheumatol 34 212--215 2005/TakizawaY. SawadaT. SuzukiA. YamadaR. InoueT. and YamamotoK.

11. CUL1, a component of E3 ubiquitin ligase, alters lymphocyte signal transduction with possible effect on rheumatoid arthritis./ Gen. Immun. 6 194--202 2005/KawaidaR. YamadaR. KobayasiK. TokuhiroS. SuzukiA. KochiY. ChangX. SekineA. TsunodaT. SawadaT. FurukawaH. NakamuraY. and YamamotoK.

2. 学会発表

<海外>

1.Genome-wide map of gene-based and block-based haplotypes and tag SNPs and comparison of power for association study/13th Takeda Science Foundation Symp. on Bioscience on Genome Analysis and Medicine/Tokyo/Dec.2004/TsunodaT. LathropG.M. SekineA. YamadaR. TakahashiA. OhnishiY. TanakaT. and NakamuraY.

2. The quantification of the allelic variations of gene expression by real-time TaqMan PCR/The American Society of Human Genetics 55th Annual Meeting (ASHG 2005)/ Salt Lake City/USA/2005 Oct./ KobayasiK., SuzukiA., KochiY., YamadaR., and YamamotoK.

<国内>

1. 自己免疫疾患感受性 SNP の人種差の検討/第 49 回日本リウマチ学会総会・学術集会/横浜/2005 年 4 月/森美賀子, 山田亮, 小林香子, 川井田礼美, 山本一彦

2. 関節リウマチとの関連が報告された SNPs についての日本人での追認関連解析/第 49 回日本リウマチ学会総会・学術集会/横浜/2005 年 4 月/小林香子, 高地雄太, 山田亮, 森美賀子, 川井田礼美, 山本一彦

3. 関節リウマチ感受性遺伝子 FCRL3 の同定/第 49 回日本リウマチ学会総会・学術集会/横浜/2005 年 4 月/高地雄太, 山田亮, 山本一彦

4. ユビキチンリガーゼの構成成分 CUL1 は血球のシグナル伝達系を介して RA の罹患率へ影響を与える可能性を持つ/第 49 回日本リウマチ学会総会・学術集会/横浜/2005 年 4 月/川井田礼美, 山田亮, 小林香子, 高地雄太, 沢田(哲治), 山本一彦

5. SNP による大規模 LD マッピング/第 49 回日本リウマチ学会総会・学術集会/横浜/2005 年 4 月/川口喬久, 川上弘人, 山田亮, 関根章博, 中村祐輔, 山本一彦, 角田達彦

6. 免疫スクリーニング法による関節リウマチ関連遺伝子 peptidylarginine deiminase type four (PADI4)の基質同定/第 28 回日本分子生物学会年会/福岡/2005 年 12 月/山中美弥子, 鈴木亜香里, 菅野栄美, 岡崎優子, 沢田哲治, 山田亮, 山本一彦

7.シトルリン化フィブリノーゲンにおける関節リウマチの自己抗原部位の同定/第 35 回免疫学会総会・学術集会/横浜/2005 年 12 月/菅野栄美, 山田亮, 山中美弥子, 瀧澤泰伸, 沢田哲治, 山本一彦

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
   特になし
2. 実用新案登録
   特になし
3. その他
   特になし

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

新しい関節リウマチ関連遺伝子の同定とその機能解析

分担研究者　高地　雄太　独立行政法人理化学研究所遺伝子多型研究センター研究員

研究要旨　関節リウマチは，他の多くの自己免疫疾患と同様に，遺伝因子と環境因子が複雑に関与して発症する多因子疾患である．我々は，ホールゲノムに分布する一塩基多型（SNPs）を用いた患者対照関連解析により，関節リウマチを含む複数の疾患感受性に関連する FCRL3（Fc receptor-like 3）遺伝子の SNP 同定を行った．FCRL3 遺伝子多型は，遺伝子プロモーター領域に存在し，疾患感受性アレルでは転写因子 NFκB との強い結合を介して B 細胞における FCRL3 の高発現をもたらす．疾患感受性アレルを持つ患者血清では，関節リウマチ関連自己抗体の産生の増強を認めた．また，全身性エリテマトーデス，自己免疫性甲状腺炎の患者検体を用いた関連解析では，FCRL3 はこれらの疾患においても，疾患感受性に関連が明らかになった．FCRL3 は機能未知の遺伝子であるが，自己応答性 B 細胞を活性化することにより，自己免疫応答に関与している可能性が考えられた．

A. 研究目的

ホールゲノムに分布する一塩基多型（SNPs）を用いた関連解析により，関節リウマチの疾患感受性に関連する遺伝子の探索および同定を行った．

B. 研究方法

関節リウマチ患者群（830 人）および対照群（658 人）の DNA 検体を用いて，インベーダー法による SNP のジェノタイピングを行い，各 SNP のアレル頻度を比較することにより，疾患感受性に関連する遺伝子多型の同定を行った．また，疾患に関連する多型については，疾患への関与を，分子生物学的手法および生化学的手法をもちいた機能解析により明らかにした．

（倫理面への配慮）　ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（厚生労働・文部科学・経済産業 3 省合同指針）に基づき研究計画を策定し，理化学研究所倫理委員会の審査を経た上で，研究を行った．DNA 検体および臨床情報は，連結可能匿名化を行い，研究者とは独立した個人情報管理者による対応表の管理を行った．

C. 研究結果

全ゲノム領域にに分布する SNPs を用いた患者対照関連解析により，1 番染色体 21-23 領域に存在する SNPs に疾患との強い関連が認められた．この領域は，ヒトおよびマウスの疾患モデルにおいて，複数の自己免疫性疾患の感受性候補領域であり，共通の遺伝因子の存在が示唆されている．そこで，この領域（16Mbp）に存在する 742

SNPs を用いて，詳細な関連解析を行った．これらの多型について RA 患者 830 人および対照群 658 人のジェノタイピングを行い，患者・対照群でアレル頻度の比較をしたところ，FCRL3（Fc receptor-like 3）遺伝子のプロモーター領域の SNP（-169C→T）が RA 感受性と強い関連を示すことが明らかにされた（オッズ比 1.37, P＝0.000035）．

この多型（-169C→T）の疾患へ関わりを解析するため，周辺配列を用いて，ルシフェラーゼアッセイおよびゲルシフトアッセイを行ったところ，この多型は転写因子 NFκB の結合を介して，遺伝子発現量を制御していることが明らかになった．すなわち，RA 患者群で頻度の高い-169C アレルの配列に，NFκB が強く結合し，その結果，FCRL3 遺伝子の発現が増強されることが示された. 実際に, 健常人の B リンパ球の RNA を用いた解析では，-169C/C，-169C/T，-169T/T というジェノタイプの順で, FCRL3 の発現量が高かった．したがって，-169C アレルを持つ個人において，FCRL3 遺伝子の発現量が増加し，結果として疾患感受性を高めていることが考えられた．

FCRL3 多型の病態への影響を調べるため, RA 患者血清における自己抗体を解析した（東京大学医学部アレルギーリウマチ内科との共同研究．分担研究者：沢田哲治）．その結果, RA 感受性ジェノタイプを持つ患者群において，リウマトイド因子や，近年その疾患特異性が注目されている抗環状シトルリン化ペプチド抗体といった，関節リウマチ関連自己抗体の産生が増強していた．これらの抗体は，疾患の重症度との関連が報告されていることから，FCRL3 多型は，疾患の予後予測因子になりうることが示唆された．

次に, FCRL3 多型と HLA-DR 多型との関連を検討した．関節リウマチ患者群（719 人）と対照群（337 人）の比較では，HLA-DRB1*0405，0401，0101 といった”shared epitope”（SE，70 から 74 残基にアミノ酸配列 QRRAA,RRRAA, もしくは QKRAA を含むもの）を含むアレルの頻度が患者群で有意に高かった．患者群を SE アレルの有無でジェノタイプ別に層別化を行い，FCRL3 多型の関節リウマチ感受性アレル(-169C)のアレル頻度を調べた．その結果，SE 陽性のアレルを 2 つ持つ群と，SE を全く持たない群の比較において，前者での-169C アレル頻度が高かった（SNP -169C アレル頻度: SE +/+, 0.49 (n = 113); SE +/-, 0.43 (n = 376); SE -/-, 0.39 (n = 215); $P < 0.05$). このことは，HLA-DR 多型と FCRL3 多型の間に相互関連があることを示唆し，FCRL3 遺伝子多型は，SE 陽性患者において，疾患により寄与している可能性が考えられた．

最後に，FCRL3 多型と他の自己免疫疾患との関連を検討したところ，FCRL3 多型は，全身性エリテマトーデスや自己免疫性甲状腺炎といった他の自己免疫疾患においても，発症に関連していることが明らかになった（国立国際医療センター研究所との共同研究）．したがって，FCRL3 多型は，自己免疫疾患共通の遺伝因子である可能性が考えられた．

D. 考察

FCRL3 遺伝子は，Fcγ レセプター遺伝子との相同性が高い遺伝子群として同定された Fc receptor-like 遺伝子ファミリーに属する．そのタンパク構造から，膜型受容体としてのシグナル伝達機能が予測されているが，リガンド・機能ともに未知である．細胞内ドメインは，免疫細胞のレセプターに特徴的なチロシンモチーフを持つため，このレセプターはリガンドとの結合により，

細胞内に正もしくは負のシグナルを伝達する可能性が考えられている．FCRL3 遺伝子は，脾臓・リンパ節・扁桃といった 2 次リンパ組織の，胚中心における B 細胞での高発現が確認されている．FCRL3 遺伝子の高発現が，自己抗体産生と関連していることから，FCRL3 は胚中心における B 細胞の選択において，何らかの影響を与え，自己応答性クローンの出現およびその活性化に寄与している可能性が考えられる． FCRL3 タンパクの詳細な機能解析が，自己免疫患の病態における役割を明らかにするものと考えられ，現在解析中である（東京大学医学部アレルギーリウマチ内科との共同研究．分担研究員：藤尾圭志）．

関節リウマチは，多因子疾患であることからも推測されるように，様々な病態が混在する疾患であるが，個々の患者の病態・予後予測に基づいた治療法の選択が必ずしもできていないのが現状である．これまでにも，HLA-DR 遺伝子多型やリウマトイド因子の有無などが関節リウマチの予後と関連することが報告されているが，本研究において，FCRL3 遺伝子多型が自己抗体産生と関連するという事実は，FCRL3 遺伝子多型が，予後予測因子になりうる可能性を示唆する．今後，FCRL3 多型を用いた前向き臨床研究によって，FCRL3 遺伝子多型の臨床応用の可能性が検討されるものと考えられる．

E. 結論

ホールゲノム関連解析によって，関節リウマチを含む，複数の自己免疫疾患感受性と関連する FCRL3 遺伝子多型の同定を行った．今後 FCRL3 遺伝子の詳細な機能を解析することにより，自己免疫疾患の病態の解明が進むものと考えられる．

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kochi Y, Yamada R, Suzuki A, Harley JB, Shirasawa S, et al. A functional variant in FCRL3, encoding Fc receptor-like 3, is associated with rheumatoid arthritis and several autoimmunities. Nat Genet. 37(5):478-85, 2005
2. Kawaida R, Yamada R, Kobayashi K, Tokuhiro S, Suzuki A, Kochi Y, et al. CUL1, a component of E3 ubiquitin ligase, alters lymphocyte signal transduction with possible effect on rheumatoid arthritis. Genes Immun. 6(3):194-202, 2005
3. Chang X, Yamada R, Sawada T, Suzuki A, Kochi Y, Yamamoto K. The inhibition of antithrombin by peptidylarginine deiminase 4 may contribute to pathogenesis of rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford). 44(3):293-8, 2005
4. 高地　雄太　関節リウマチ感受性遺伝子 FCRL3 の同定．臨床免疫. 44(6):663-666, 2005
5. 高地　雄太　関節リウマチの遺伝的背景　～最近明らかにされた感受性遺伝子～ 医学のあゆみ. 215(4):259-260, 2005
6. 高地　雄太，山田　亮，山本　一彦 FCRL3 遺伝子と関節リウマチの関連．細胞工学.24(8)：832-833, 2005
7. 高地　雄太　関節リウマチと HLA～shared epitope 再考～　ゲノム医学. 5(1):27-31, 2005

2. 学会発表

1. 高地 雄太，山田 亮，山本 一彦　関節リウマチ感受性遺伝子 FCRL3 (Fc

receptor-like3)の同定. 第49回日本リウマチ学会総会・学術集会

2. 高地　雄太　A regulatory variant in FCRL3 gene is associated with susceptibility for multiple autoimmune diseases. 第35回日本免疫学会総会・学術集会

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
   特になし
2. 実用新案登録
   特になし
3. その他
   特になし

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム·再生医療等研究事業）
分担研究報告書

関節リウマチおよび変形性関節症の病態解析に関する研究

分担研究者　井上　和彦　東京女子医科大学東医療センター　整形外科　教授

研究要旨　関節リウマチおよび変形性関節症の病態の遺伝子学的解明は未だ明確なものはない。しかしながら治療においては関節リウマチに抗 TNF-α 抗体などを用いた生物学的製剤による治療など近年めざましい発展を遂げている。こうした特定の分子を標的とした治療が関節疾患で有効であることは、病態の解明に対しても遺伝子学的アプローチにより解析できる可能性がある。我々は生物学的製剤使用中の関節リウマチの臨床評価と血清のサイトカイン濃度を調べ、IL-6 が有意に生物学的製剤により減少したことを確認した。さらに変形性関節症の病態解析のためメカニカルストレスに着目し軟骨細胞において DNA マイクロアレイによって生体内リズムを調節する遺伝子 CLOCK の発現抑制を認め変形性関節症においてタンパクレベルにおいてもその抑制を確認した。関節リウマチにおいてこの CLOCK 遺伝子と IL-6 の発現調節において遺伝子レベルで解析中である。

A. 研究目的

関節疾患である関節リウマチおよび変形性関節症の病態の遺伝子学的解明を目的とし、現在関節リウマチにおいて生物学的製剤における抗サイトカイン療法でのどのような分子が臨床効果に関連し発現変化しているか、またそれがどのような遺伝子発現と関係しているか解明することである。

B. 研究方法

関節リウマチに対して生物学的製剤を用いて治療した患者血清中の IL-1β, IL-6, TNF-α 濃度を投与前と投与後に経時的に ELISA を用いて測定する。関節滑膜細胞の初代培養において生物学的製剤添加において IL-1β, IL-6, TNF-α 濃度を濃度依存的および経時的に測定する。関節軟骨細胞を gel form 内での 3 次元培養し magnetic force を利用してメカニカルストレスをかけ、4 日後の軟骨細胞の RNA を抽出し 12000 遺伝子を DNA マイクロアレイを用いて一度に発現変化を調べる。促進および抑制遺伝子を抽出し病態解明につながる遺伝子候補を挙げてリアルタイム PCR 法にて確認する。候補遺伝子のうち一つが生物学的製剤を用いて治療した関節リウマチのサイトカイン産生とどのような関連性があるか滑膜細胞および破骨前駆細胞、間葉系幹細胞を用いてどの細胞に DNA マイクロアレイで抽出した遺伝子が生物学的製剤により影響を受けサイトカイン産生に関与するか RT-PCR,および ELISA 法にて調べる。

（倫理面への配慮）　倫理委員会の承認および十分な患者からインフォームドコンセントを得た上で研究を遂行する。

C. 研究結果

関節リウマチに対して生物学的製剤を用いて治療した患者血清中の IL-1β, IL-6, TNF-α 濃度は IL-1β、TNF-α は有意な変化を認めなかったが、IL-6 は生物学的製剤投与前と比べて有意に減少を認めた。これは抗 TNF-α 抗体による治療により TNF-α の濃度は血清中では変化せず IL-6 のみ炎症反応改善に関与していたことを示している。この IL-6 の変化は CRP の炎症反応の有意な減少と相関を認めた。次に軟骨細胞の 3 次元培養でメカニカルストレスをかけて変化した遺伝子を DNA マイクロアレイを用いて調べたところ生体内リズムを司る CLOCK 遺伝子が発現抑制していることをつきとめた。CLOCK 自体の発現変化もリアルタイム PCR 法にて経時的にリズムをつくって発現していることを認めた。現在関節リウマチにおける IL-6 の発現と CLOCK 遺伝子の関連性を調べるために滑膜細胞および破骨前駆細胞、間葉系幹細胞を用いて RNA およびタンパクレベルで生物学的製剤における発現変化を解析中である。

D. 考察

関節リウマチに対して画期的な治療薬である抗サイトカイン療法の生物学的製剤により IL-6 が減少し炎症反応が抑制されることを見出した。しかしながら、どのようなメカニズムでこの IL-6 と CRP の減少が結びついているかを解明することが今後の課題である。さらに変形性関節症にてメカニカルストレスとの関連性から CLOCK 遺伝子抑制を病態解明の鍵となる遺伝子として見出しこの発現が軟骨細胞において生体内リズムをつくり発現変化をしていることを見出した。この CLOCK 遺伝子がいかにして滑膜細胞、破骨前駆細胞、および間葉系幹細胞において IL-6 と連動するか調べ、どの細胞が生物学的製剤により反応しているかを見つけることが重要である。

E. 結論

関節疾患である関節リウマチおよび変形性関節症の病態の遺伝子学的解明の鍵となる遺伝子として CLOCK 遺伝子を発見した。これはメカニカルストレスにより軟骨細胞で発現抑制を受けるが、これにより軟骨代謝に変化をきたして関節破壊へと進む可能性がある。今後、生物学的製剤により IL-6 が減少することが CLOCK 遺伝子にも影響している可能性があり将来さらなる研究を必要とする。

F. 健康危惧情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kanbe K, Inoue K, Xiang C, Chen Q. Identification of clock as a mechano-sensitive gene by large-scale DNA microarray analysis: down-regulation in osteoarthritic cartilage. Modern Rheumatology. in press, 2006.

2. 学会発表

Kanbe K, Inoue K, The Efficacy and Safety of Infliximab for Rheumatoid Arthritis.

1st East Asian group of Rheumatology meeting (EAGOR), Tokyo, 2005. 5.28

H. 知的財産権の出願登録状況

1. 特許取得

   特になし

2. 実用新案登録

   特になし

3. その他

   特になし

III.　研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻	頁	出版年
Okazaki Y, Suzuki A, Sawada T, Ohtake-Yamanaka M, Inoue T, Hasebe T, Yamada R, Yamamoto K.	Idetification of citrullinated eukaryotic translation initiation factor 4G1 as novel autoantigen in rheumatoid in rheumatoid arthritis.	Biochem Biophys Res Commun.	341	94-100	2006
Kochi Y, Yamada R, Suzuki A, Harley JB, Shirasawa S, Sawada T, Bae SC, Tokuhiro 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 FCRL3, encoding Fc receptor-like 3, is associated with rheumatoid arthritis and several autoimmunities.	Nature Genet.	37	478-485	2005
Chang X, Yamada R, Suzuki A, Sawada T, Yoshino S, Tokuhiro S, Yamamoto K.	Localization of peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) and citrullinated protein in synovial tissue of rheumatoid arthritis.	Rheumatology.	44	40-50	2005
Nakayama-Hamada M, Suzuki A, Kubota K, Takazawa T, Ohsaka M, Kawaida R, Ono M, Kasuya A, Furukawa H, Yamada R, Yamamoto K.	Comparison of enzymatic properties between hPADI2 and hPADI4.	Biochem Biophys Res Commun.	327	192-200	2005
Kawaida R, Yamada R, Kobayashi K, Tokuhiro S, Suzuki A, Kochi Y, Chang X, Sekine A, Tsunoda T, Sawada T, Furukawa H, Nakamura Y, Yamamoto K.	CUL1, a component of E3 ubiquitin ligase, alters lymphocyte signal transduction with possible effect on rheumatoid arthritis.	Genes Immun.	6	194-202	2005
Yamada R, Yamamoto K.	(Review) Recent findings on genes associated with inflammatory disease.	Mutation Res.	573	136-151	2005
Mori M, Yamada R, Kobayashi K, Kawaida R, Yamamoto K.	Ethnic differences in allele frequency of autoimmune-disease-associated SNPs.	J Hum Genet.	50	264-266	2005
Suzuki A, Yamada R, Ohtake-Yamanaka M, Okazaki Y, Sawada T, Yamamoto K.	Anti-citrullinated collagen type I antibody is a target of autoimmunity in rheumatoid arthritis.	Biochem Biophys Res Commun.	333	418-426	2005
Yamamoto K, Yamada R.	Genome-wide single nucleotide polymorphism analyses of rheumatoid arthritis.	J Autoimmun.	25	12-15	2005
Ohtsubo S. Iida A. Nitta K. Tanaka T. Yamada R. Ohnishi Y. Maeda S. Tsunoda T. Takei T. Obara W. Akiyama F. Ito K. Honda K. Uchida K. Tsuchiya K. Yumura W. Ujiie T. Nagane Y. Miyano S. Suzuki Y. Narita I. Gejyo F. Fujioka T. Nihei H. Nakamura Y.	Association of a single-nucleotide polymorphism in the immunoglobulin μ-binding protein 2 gene with immunoglobulin A nephropathy.	J Hum Genet.	50	30-35	2005
Nakayama M. Horiguchi A. S. Kubota K. Takazawa T. Ohsaka M. Kawaida R. Ono M. Kasuya A. Furukawa H. Yamada R. Yamamoto K.	Comparison of enzymatic properties between hPADI2 and hPADI4.	Biochem Biophys Res Commun.	327	192-200	2005
Chang X. Yamada R. Yamamoto K.	Inhibition of antithrombin by hyaluronic acid may be involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.	Arthritis Res Ther.	7	R268-R273	2005