

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18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山 本 一 彦

平成19年3月

I. 総括研究報告

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 教授

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ことを中心に研究を進め、さら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サンプル収集も進めた。

分担研究者

井上 和彦 東京女子医科大学東医療センター
整形外科 教授

岩倉洋一郎 東京大学医科学研究所
ヒト疾患モデル研究センター 教授

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

高地 雄太 理化学研究所
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
アレルギーリウマチ内科 助手

川畑 仁人 東京大学医学部附属病院
アレルギーリウマチ内科 助手

神田 浩子 東京大学医学部附属病院
アレルギーリウマチ内科 助手

藤尾 圭志 東京大学医学部附属病院
アレルギーリウマチ内科 助手

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 遺伝子以外は容易ではない。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に関しては、候補遺伝子的なアプローチだけでは限界があり、未知の遺伝子を見いだすには仮説なしの全ゲノム解析が1つの方向と考えられている。この点で、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指摘されている。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

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

に有望視され始めている。

我々はゲノムワイドに一塩基多型 (SNP) 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、SLC22A、RUNX1、FCRL3 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 peptidylarginine 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きている。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。

そこで昨年度に、PADI4 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する研究をスタートした。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 (eIF 4G1) (Okazaki Y. et al. BBRC 341:94-100, 2006) が同定された。さらに、リコンビナント eIF 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。本年度はさらにこれを進めたが、現在のところ新しい標的分子は見いだされていない。

PADI4 のトランスジェニック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可能性が出てきた。一方、本年度はノックアウトマウスの作成が成功した。現在、C57BL/6 と DBA/1 マウスへのバッククロスを進行させている。すでに両系統に II 型コラーゲンを免疫して惹起する関節炎モデルにおいて、関節炎とともに PADI4 が関節内で発現することは確認しており、ノックアウトマウスでの関節炎形成の解析を行う予定である。

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である。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に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。

最近まで、SLC22A4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ったが、ドイツのグループがエルゴチオネインが輸送基質になることを報告した。そこで培養細胞(A549肺癌細胞)にエルゴチオネインを加えた後、炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子(TNF α)刺激を加えると、コントロールに比べ、IL-8の産生が低下することが判明した。そこで、現在、SLC22A4を過剰発現またはノックダウンすることで発現量を変化させることで、エルゴチオネイン存在下で、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。

3. 臨床情報との詳細な比較

関連解析では、日本人DNAサンプルの充実が必要である。これを進めるため、東京女子医大東医療センターを中心とした我が国のリウマチセンターコンソーシアムとの提携し、発症10年以上の診断確実例の収集を進めている。

2つ以上の疾患関連遺伝子の遺伝子型の組み合わせで形成される遺伝子多型頻度を、疾患vs.対照(case vs. control)や臨床情報によるサブタイプと比較する作業を、DNAサンプルの充実とともに、作業を進めている。

4. 民族差の問題

PADI4に関しては、日本の大規模サンプル(東京女子医大)および韓国人サンプルを用いた、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ており、アジア人においてはRA疾患感受性遺伝子として確実視されている。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ている(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、韓国、オランダ、フランス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。本年度は、オランダから1000人規模のRA患者DNAサンプルが供与された。

(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。本年度は PADI4 のノックアウトマウスが確立できたことから、これらに関して、引き続き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。

SLC22A4 に関しては、輸送基質であるエルゴチオネインが抗酸化物質であり、これの細胞内輸送による炎症反応への関与が当面解決すべき対象である。

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. Gotoh N, Yamada R, Hiratani H, Renault V, Kuroiwa S, Monet M, et al. No association between complement factor H gene polymorphism and exudative age-related macular degeneration in Japanese. Hum Genet. J Immunol. 120:139-43, 2006.
2. Okazaki Y, Suzuki A, Sawada T, Ohtake-Yamanaka M, Inoue T, Hasebe T, Yamada R, et al. Identification of citrullinated eukaryotic translation initiation factor 4G1 as novel autoantigen in rheumatoid arthritis. Biochem Biophys Res Commun. 341:94-100, 2006.
3. Yamada R, Yamamoto K, Holmdahl RE. Gene-based large scale LD-mapping of rheumatoid arthritis-associated genes. The Hereditary Basis of Rheumatic Diseases. 2006.
4. Shoda H, Fujio K, Yamaguchi Y, Okamoto A, Sawada T, Kochi Y, Yamamoto K. Interactions between IL-32 and tumor necrosis factor alpha contribute to the exacerbation of

immune-inflammatory diseases. Arthritis Res Ther.
8:R166, 2006

5. Kochi Y, Shimane K, and Yamamoto K

The genetics of systemic lupus erythematosus:
differences across ethnicities APLAR J Rheumatol.
9:353-58, 2006

6. Kanbe K, Inoue K. Efficacy of arthroscopic synovectomy for the effect attenuation cases of infliximab in rheumatoid arthritis. Clin Rheumatol. 25:877-881,2006.

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

関節リウマチの生物学的製剤による骨破壊抑制効果に関する研究

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(RA)に対して近年、生物学的製剤による治療が行なわれているが、すべての症例で骨破壊抑制に効果あるわけではない。臨床的に骨破壊抑制効果を調べると尿中クレアチニン換算値は1年以上インフリキシマブを使用した10例において重回帰分析により有意にリウマチ因子の低い症例において骨破壊抑制効果が見られた。インフリキシマブで治療した関節リウマチ157例において10例にインフリキシマブ投与中止した寛解となった(6.5%)。寛解における骨破壊抑制効果はレントゲン上手指関節において改善傾向があったが膝、股関節などの大関節では改善は認められなかった。血清中のIL-6濃度は有意に投与後2週間で低下したがTNF- α は有意差はなかった。人工関節時に採取した骨組織においてインフリキシマブ効果有効例では類骨増生と破骨細胞数低下および骨芽細胞数増加を認めた。さらに人工肘関節時の軟骨組織においてインフリキシマブにおいて軟骨修復が組織学的に認められた。両側人工膝関節時に採取した滑膜組織からのmRNAの発現変化をDNAマイクロアレイビーズにて解析中である。

A. 研究目的

RAの治療は近年寛解を目標とすることが叫ばれており、従来の抗リウマチ薬にない治療効果、特に骨関節破壊抑制さらには改善効果が臨床的に認められている。RAは発症から5年で75%が骨関節破壊がおこるとされており、これをいかに防止するかがRAの治療では重要である。欧米で広く用いられている臨床評価Disease Activity Score (DAS) 28をにより寛解の指標が獲得できる。こうした中で我が国では2003年7月よりRAに対してインフリキシマブの使用が開始された。インフリキシマブは、ヒトTNF α をマウスに免疫し、マウスが産生した抗ヒトTNF α 抗体のV領域の遺伝子とヒトIgG1 κ 鎖のC領域の遺伝子を連結し作成されたキメラ型抗TNF α モノクローナル抗体である。TNF α は単球やマクロファージから産生されTNF β は主にリンパから産生される。TNF α は細胞膜上のTNFレセプターであるp55とp75に結合しNF κ Bを介して炎症性サイトカインが産生される。インフリキシマブはこのTNF α と特異的に結合することにより、TNF α が標的細胞上の

TNF α レセプターであるp55とp75に結合するのを阻害し、結果的にTNF α の生物学的作用を抑制する。こうした分子生物学的作用により臨床的にインフリキシマブ投与により2週間で97.5%の症例でc-reactive protein (CRP)が50%以下に減少する。現在、日本人に対する骨関節破壊抑制効果については現在のところ解析段階である。当施設においてインフリキシマブを使用して治療した157例のうち寛解に至ったのは10例でありCRPの陰性化は継続している。寛解に至らない症例についてもレントゲン上骨破壊抑制さらには改善まで認めている。こうした生物学的製剤の骨破壊抑制効果の機序解明はRAの病態を治療の側から解明する一つの手段として期待できる。インフリキシマブの投与により骨および軟骨の修復について現在のところ詳細な研究報告はない。本研究はRAに対するインフリキシマブによる骨軟骨修復機所を臨床的評価、画像評価、手術時標本による組織学的評価、分子生物学的手法を用いて統計学的に解明することを目的とする。

B. 研究方法

RA においてインフリキシマブで治療した症例の臨床評価 DAS28, CRP(dl/ml), 抗リウマチ因子(RAPA)、血清サイトカイン IL-1 β , TNF- α , IL-6, を計測し両手単純レントゲン写真を van der heijde Sharp score (van der Heijde. J Rheumatol 2000;27:261-3)にて比較検討を行う。インフリキシマブ投与中に施行した人工関節置換術においてインフォームドコンセントを得た上で骨、軟骨を採取し組織学的に類骨増生、破骨細胞、骨芽細胞の増加の有無、軟骨損傷部の修復の有無を TNF- α , IL-6, OPG, RANKL の免疫染色にて調べる。骨代謝マーカー尿 NTx、血清 NTx、脊椎 BMD を計測する。さらにインフォームドコンセントを得た上で、滑膜組織を採取し mRNA を抽出して DNA マイクロアレイビーズにより発現変化を解析する。

C. 結果

RA 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-1 β , IL-6, TNF- α 濃度は IL-1 β , 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。骨破壊抑制効果を調べると尿中クレアチニン換算値は1年以上インフリキシマブを使用した 10 例において重回帰分析により有意にリウマチ因子の低い症例において骨破壊抑制効果が見られた(p=0.035)。インフリキシマブで治療した関節リウマチ 157 例において 10 例にインフリキシマブ投与中止した寛解となった(6.5%)。寛解における骨破壊抑制効果はレントゲン上手指関節において改善傾向があった。が膝、股関節などの大関節では改善は認められなかった。

D. 考察

RA の治療においてインフリキシマブにより全例が骨関節破壊抑制効果があるのではなくリウマチ因子が低く RAPA が 80 以下の症例にて有意に尿中クレ

アチニン換算値の低下を認めた。このことは TNF- α の抗体であるインフリキシマブがリウマチ因子と骨関節破壊抑制効果という機能に対して競合的に働いていることを示唆するものであり、さらにはこれまで明解でなかったリウマチ因子自体の機能解明にもつながるものであろう。また寛解に入る症例もリウマチ因子の低いものが多く生物学的製剤と骨関節破壊抑制効果のメカニズムが解明されつつある。さらに滑膜のインフリキシマブによる mRNA の発現変化は現在研究中でありこれらのデータと合わせて現在骨関節破壊抑制効果の分子メカニズムを解明している。

E. 結論

RA の治療において生物学的製剤であるインフリキシマブの使用において骨関節破壊抑制効果のメカニズムの一つとして統計学的にリウマチ因子の低い症例において尿中クレアチニン換算値の低下を有意に認めた。このことは RA の病態解明とリウマチ因子の機能解明につながる重要なエビデンスであり治療面においても生物学的製剤の適応に参考になるデータである。今後さらに滑膜の mRNA 発現変化の解析により骨関節破壊抑制効果の因子を解明する必要がある。

F. 健康危惧情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Efficacy of arthroscopic synovectomy for the effect attenuation cases of infliximab in rheumatoid arthritis. Kanbe K, Inoue K. Clin Rheumatol 2006; 25:877-881, 2006.

2. 関節リウマチに対する滑膜切除の効果

神戸克明、井上和彦 総合臨床 55:341-343, 2006.

2. 学会発表

1. Arthroscopic synovectomy for the effect attenuation

cases during infliximab treatment in rheumatoid arthritis.

Kazuhiko Inoue, Katsuaki Kanbe

14th European Rheumatoid Arthritis Surgical Society
(ERASS) meeting, Pfföfikon/Zurich, Switzerland, on
May 25-26, 2006.

H. 知的財産権の出願登録状況

特許取得及び実用新案登録は予定も含めてない。

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、集団における SNP の生起・定着機構について、HapMap プロジェクトデータを用いて検討した。

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

本年度は、連鎖不平衡マッピングの主要マーカーである SNP の連鎖不平衡状態について考察し、その生起由来の IBD(Identity by descent)、IBS(Identity by state)の別と、現存 SNP の原因変異事象の単複比率についての検討を行った。

(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

HapMap プロジェクトより利用可能な非常に大規模なデータについて、SNP およびその連鎖不平衡状態を検討するために、昨年度までに構築した、各種ツール（以下にリスト）を、大規模データに適用可能なように改変した。

その上で、SNP の生起消滅および、SNP ペアの連鎖不平衡状態をモデル化した。SNP ペアの連鎖不平衡状態の推移について、変異・組み換え・ドリフトによって定義するとともに、その推移を SNP ペア間の遺伝的距離の関数として表現した。

HapMap プロジェクトの膨大なデータから得られる多数の SNP ペアについて、連鎖不平衡状態をモデルに適用することによって、HapMap プロジェ

クトに用いられている SNP アレルの起源が同一であるか、複数の変異に由来するとみなすべきかを推論した。その結果、連鎖不平衡解析上、無視しえない比率で、複数変異事象に由来する SNP が存在することが予想された。

基本解析ツールリスト

- ・ Pairwise LD
 - r^2 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
 - ・ Fisher の正確確率検定 (大規模データ対応)
 - 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
 - ・ Tippete 関数
 - ・ Fisher 関数
 - ・ Liptak logit 関数
 - FDR 補正

- ・ TagSNP 選別
 - r2-greedy 法
 - Optimum solution 法

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。連鎖不平衡解析の原理である SNP の多起源性についての理解が進んだ。

E. 結論

SNP を用いた連鎖不平衡解析はマーカーとしての SNP と感受性多型との間の連鎖不平衡を用いる。その SNP のアレルの由来が同一であることを前提にして、スタディデザインが検討されているのが通常であるが、複数の変異に起源を持つ SNP の比率が無視しえないことが予想され、スタディデザインに再検討の余地があることが示唆された。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Gotoh N, Yamada R, Hiratani H, Renault V, Kuroiwa S, Monet M, et al. No association between complement factor H gene polymorphism and exudative age-related macular degeneration in Japanese. *Hum Genet.* 2006 Aug;120(1):139-43.
2. Okazaki Y, Suzuki A, Sawada T, Ohtake-Yamanaka M, Inoue T, Hasebe T, Yamada R, et al. Identification of citrullinated eukaryotic translation initiation factor 4G1 as novel autoantigen in rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Mar 3;341(1):94-100.
3. Yamada R, Yamamoto K, Holmdahl RE. Gene-based large scale LD-mapping of rheumatoid arthritis-associated genes. *The Hereditary Basis of Rheumatic Diseases.* 2006.

2. 学会発表

1. Yamada R, et al. Inference of polyphyletic SNP-ratio by zero-distance limit of fraction of SNP

pairs in complete linkage disequilibrium. New Orleans, LA, USA, 2006

2. Yamada R. Location-oriented extraction and visual presentation of association strength for case-control SNP genotype data in a candidate region. Poster presentation at Genetic Analysis Workshop 15, Tampa, FL, 2006

3. Yamada R, et al. Multiple marker LD index of SNPs and the method to plot their pertinent components. Tampa, FL, USA, 2006

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

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

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

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、全身性エリテマトーデス、自己免疫性甲状腺炎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 NF κ B 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。また、FCRL3 の発現量は、NFKB1 遺伝子多型のジェノタイプによって変化することが明らかになった。FCRL3 は細胞内に、リンパ球受容体に特徴的な活性化型モチーフ（ITAM）および抑制型モチーフ（ITIM）を持つ。B 細胞株を用いた解析では、FCRL3 は、B 細胞レセプター（BCR）によってもたらされる細胞内シグナルを抑制することが明らかになった。今後、FCRL3 に結合するリガンド分子の同定、マウスの対応遺伝子である Fcrl5 の機能解析をすすめ、関節リウマチ治療のターゲット分子としての検討を行う。

A. 研究目的

関節リウマチ感受性遺伝子 FCRL3 に注目し、病態への関わりを明らかにするとともに、同遺伝子を標的とした治療法の開発のための基盤研究を行う。また、FCRL3 遺伝子多型と、他の遺伝子多型との相互関連について検討を行う。

B. 研究方法

1) FCRL3 の機能解析

FCRL3 キメラタンパク（細胞外ドメイン；マウス Fcgr2b、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン；FCRL3 由来）の発現コンストラクトを作製し、B 細胞株である ST486 細胞を用いて、安定発現株の作製を行った。FCRL3 キメラタンパク安定発現株を用いて、*in vitro* の実験系（細胞内 Ca²⁺イオン流入アッセイ、アポトーシス誘導アッセイ、細胞内チロシン残基のリン酸化アッセイ）において、BCR シグナルに対する影響を評価した。また、FCRL3 細胞内のチロシンモチーフ（ITAM, ITIM）に対応するリン酸化ペプチドを合成し、これらのモチーフに結合する分子の同定を行った。

2) FCRL3・NFKB1 遺伝子多型の相互関連

FCRL3 遺伝子多型と、相互作用をする可能性のある NFKB1 遺伝子多型との関連を、遺伝子型別の遺伝子発現量とともに評価を行った。

（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

1) FCRL3 の機能解析

安定発現株上の FCRL3 キメラタンパクと、BCR を共架橋すると、BCR 単独架橋をした場合に誘導される、Ca²⁺イオンの流入、細胞内タンパクのチロシン残基のリン酸化、アポトーシスは、それぞれ抑制された。FCRL3 キメラタンパクの細胞内チロシン残基（Tyr650, Tyr662, Tyr692, Tyr722）をすべてフェニルアラニンに置換すると、これらの BCR シグナルの抑制機能は消失した。したがって、BCR シグナルの抑制には、これらのチロシン残基が必須であることが考えられた。

FCRL3 細胞内チロシン残基の周辺配列は、既知の ITAM, ITIM といったモチーフとの相溶性が高い。これらのモチーフに結合する分子の同定を行うため、これらの配列に対応するチロシンリン酸化ペ

プチドを合成した。これらのペプチドを用いて、ST486 細胞ライセートから、結合タンパクの共沈降を行った。その結果、Tyr650/Tyr662 で構成される ITAM モチーフペプチドに、チロシンキナーゼ Syk が結合し、Tyr662, Tyr692 の ITIM モチーフに SHIP, SHP-1, SHP-2 といった脱リン酸化酵素が結合することが明らかになった。FCRL3 総体では、BCR シグナルに対して、抑制的に機能することから、これらの ITIM およびそれに結合する脱リン酸化酵素の働きが優位になることによって、FCRL3 による抑制作用が働くことが考えられた。

2) FCRL3・NFkB1 遺伝子多型の相互関連

FCRL3 遺伝子多型は、プロモーター領域にあり、転写因子 NFkB の結合を増強することにより、遺伝子発現を増加させ、疾患発症のリスクを高めると考えられる (Kochi et al. Nat Genet 2006)。FCRL3 遺伝子多型と他の遺伝因子との相互関連を調べるために、NFkB1 遺伝子多型に注目した。NFkB1 は、NFkB の構成分子であり、そのプロモーター多型 (-94 ins/del) が、遺伝子発現を調節するとともに、潰瘍性大腸炎の疾患感受性に関連することが報告されている (Karban et al. Hum Mol Genet 2004)。まず、関節リウマチ患者 830 人と、対照群 658 人に対して、NFkB1 遺伝子多型のジェノタイピングを行ったところ、患者対照間で有意差を認めなかったため、NFkB1 遺伝子多型の RA 感受性への寄与度は低いものと考えられた。次に、健常者 17 人の末梢血 B 細胞における FCRL3 の発現量を、NFkB1 遺伝子多型別に評価したところ、NFkB1 ins/ins, del/ins del/del genotype の順で、FCRL3 の発現量が高いことが明らかになった。このことは、NFkB1 遺伝子多型が、Trans-acting factor として、FCRL3 発現量を制御していることを示唆した。

D. 考察

FCRL3 遺伝子は、Fc γ レセプター遺伝子との相関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った

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。我々の行った安定発現株での解析結果により、FCRL3 遺伝子は BCR によるシグナルを抑制する。したがって、FCRL3 は BCR の抗原刺激に対する閾値を上げることにより、B 細胞の選択に影響を与えていることが考えられた。同様の現象は、マウスの自己免疫疾患モデルでも報告されており (Kumar et, Science 2006)、B 細胞の免疫寛容の破綻のひとつのメカニズムとして考えられる。

関節リウマチは、多因子疾患であることから推測されるように、様々な病態が混在する疾患である。また、人種間によっても、遺伝素因の違いが明らかになってきている。FCRL3 遺伝子多型が、ユーカシアン人種においても、疾患感受性に関与しているかについては、議論が残るところであるが、スペイン人における関節リウマチ患者検体を用いた関連解析では、NFkB1 遺伝子多型によって患者群を層別化することにより、FCRL3 遺伝子多型が疾患感受性に寄与していることが明らかにされている (Martinez et al. Ann Rheum Dis. 2006)。我々の行った、NFkB1 の遺伝子型別による FCRL3 発現量の解析結果は、NFkB1 遺伝子型によって、FCRL3 遺伝子多型の寄与度が異なることを強く示唆し、疾患感受性の人種間の相違を説明できる可能性がある。

E. 結論

関節リウマチ感受性遺伝子 FCRL3 は、BCR のシグナルを抑制することによって、B 細胞の免疫寛容に影響することが考えられた。また、FCRL3 遺伝子多型の疾患への寄与度は、NFkB1 遺伝子多型の存在によって影響を受ける可能性が考えられた。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

(英文)

- 1) Shoda H, Fujio K, Yamaguchi Y, Okamoto A, Sawada T, Kochi Y, Yamamoto K.
Interactions between IL-32 and tumor necrosis factor alpha contribute to the exacerbation of immune-inflammatory diseases. *Arthritis Res Ther.* 2006 Nov 1;8(6):R166
- 2) Kochi Y, Shimane K, and Yamamoto K
The genetics of systemic lupus erythematosus: differences across ethnicities
APLAR Journal of Rheumatology 9(4) Page 353-58, 2006
- 3) 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

(和文)

- 1) 高地 雄太
自己免疫疾患の疾患感受性遺伝子
BIO Clinica. 21(10):876-880, 2006
- 2) 高地 雄太
新規関節リウマチ関連遺伝子 FCRL3
医学のあゆみ. 217(7):794-795, 2006
臨床免疫. 44(6):663-666, 2006
- 3) 高地 雄太
関節リウマチ感受性遺伝子 FCRL3
リウマチ科. 35(1):58-62, 2006
- 4) 高地 雄太, 山田 亮, 山本 一彦
関節リウマチ感受性遺伝子 FCRL3 の同定
臨床免疫. 45(3):310-315, 2006

2. 学会発表

- 1) 高地 雄太
ホールゲノム関連解析による関節リウマチ感受性遺伝子の同定
第21回日本整形学会基礎学術集会
- 2) 高地 雄太

連鎖不平衡解析による自己免疫疾患感受性遺伝子 FCRL3 の同定

第51回日本人類遺伝学会大会

3) 高地 雄太

ホールゲノム関連解析による関節リウマチ関連遺伝子 FCRL3 の同定

第21回日本骨代謝学会

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

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
Katsuaki Kanbe, Kazuhiko Inoue	Efficacy of arthroscopic synovectomy for the effect attenuation cases of infliximad in rheumatoid arthritis	Clin Rheumatol	25	877-881	2006
Gotoh N, Yamada R, Hiratani H, Renault V, Kuroiwa S, Monet M, et al.	No association between complement factor H gene polymorphism and exudative age-related macular degeneration in Japanese.	Hum Genet. 2006	120	139-143	2006
Okazaki Y, Suzuki A, Sawada T, Ohtake-Yamanaka M, Inoue T, Hasebe T, Yamada R, et al.	Identification of citrullinated eukaryotic translation initiation factor 4G1 as novel autoantigen in rheumatoid arthritis.	Biochem Biophys Res Commun.	341	94-100	2006
Shoda H, Fujio K, Yamaguchi Y, Okamoto A, Sawada T, Kochi Y, Yamamoto K.	Interactions between IL-32 and tumor necrosis factor alpha contribute to the exacerbation of immune-inflammatory diseases.	Arthritis Research & Therapy.	8	R166	2006
Kochi Y, Shimane K, Yamamoto K.	The genetics of systemic lupus erythematosus: differences across ethnicities	APLAR Journal of Rheumatology	9	353-358	2006
高地 雄太	新規関節リウマチ関連遺伝子FCRL3	医学のあゆみ	217	794-795	2006
高地 雄太	関節リウマチ感受性遺伝子FCRL3	リウマチ科	35	58-62	2006
高地 雄太	新規関節リウマチ感受性遺伝子FCRL3	臨床免疫	45	310-315	2006
高地 雄太	自己免疫疾患の感受性遺伝子	Bio Clinica	21	876-880	2006
神戸 克明, 井上 和彦	手術療法と生物学的製剤	リウマチ科	35	445-448	2006
神戸 克明, 井上 和彦	生物学的製剤効果不十分例に対する滑膜切除術	リウマチ科	36	198-203	2006
神戸 克明, 井上 和彦	最新の単純X線による画像評価	リウマチ科	36	266-268	2006
神戸 克明, 井上 和彦	関節リウマチにおける生物学的製剤使用時における手術療法の留意点	リウマチ科	36	594-599	2006

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名・出版地	頁	出版年
Yamada R, Yamamoto K	Gene-based large scale LD-mapping of rheumatoid arthritis-associated genes.	Holmdahl RE.	The Hereditary Basis of Rheumatic Diseases	Birkhauser Verlag Basel, Switzerland	43-57	2006
高地 雄太, 山 田亮, 山本一彦	FCRL3, 新規自己免疫関連遺伝子	岸本 忠三 編集	免疫2006	中山書店	334-340	2006